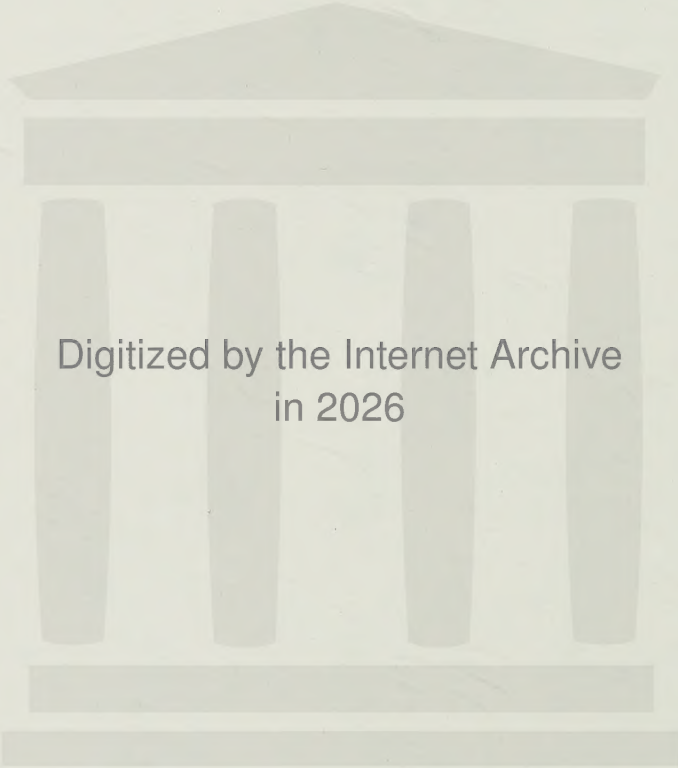


WASSERSTOFFPRODUKTION DURCH RHODOSPIRILLACEAE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
an der Freien Universität Berlin
Fachbereich Biologie

vorgelegt von
URSULA REH
Berlin, Oktober 1983





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546605_0040

WASSERSTOFFPRODUKTION

DURCH

RHODOSPIRILLACEAE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
an der Freien Universität Berlin
Fachbereich Biologie

vorgelegt von
URSULA REH
Berlin, Oktober 1983

1. Referent: Prof.Dr. I. Lamprecht

2. Referent: Prof.Dr. B. Schaarschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.83

Meinen Eltern und Michael danke ich, die meine Ausbildung ermöglicht haben.

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1981 bis April 1983 am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Krischke, der die Fertigstellung der Dissertation nicht mehr erlebte.

Ich werde ihn in dankbarer Erinnerung behalten.

Einige Versuche wurden am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. I. Lamprecht durchgeführt, dem ich für die wertvollen Anregungen und seine großzügige Unterstützung auf allen Gebieten herzlich danke.

Für das entgegengebrachte Interesse möchte ich auch Herrn Prof. Dr. B. Schaarschmidt danken.

Teile der vorliegenden Arbeit werden veröffentlicht in der Zeitschrift "Wissenschaft und Umwelt".

IV

	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1.	Einleitung	1
2.	Fragestellung	8
3.	Material	10
3.1.	Nitrogenase-Enzymkomplex und Wasserstoff- Produktion	14
3.2.	Vorkulturmedien	18
3.3.	Hauptkulturmedien	19
3.3.1.	Synthetische Medien	19
3.3.2.	Natürliche Medien	20
3.3.2.1.	Molke	20
3.3.2.2.	Rübenzuckermelasse	21
3.3.2.3.	Rohrzuckermelasse	22
3.3.2.4.	Kartoffelfruchtwasser	23
4.	Methoden	24
4.1.	Kulturgefäße	24
4.2.	Versuchsaufbau	26
4.3.	Vorkultur der natürlichen Medien	29
4.4.	Freilandversuche	29
4.5.	Manometrie	30
4.6.	Optische Messungen	32
4.6.1.	Messung der Optischen Dichte	32
4.6.2.	Messung der Beleuchtungsstärke	33
4.7.	Bestimmung der Trockenmasse	34
4.8.	Isotachophorese	34
4.9.	Flow-Kalorimetrie	37
4.10.	Verbrennungskalorimetrie	40
5.	Ergebnisse	48
5.1.	Kalibrierung der optischen Dichte gegen die Trockenmasse	48
5.2.	Verbrennungswärme der Biomasse	51

	<u>Seite</u>
5.3. Aschegehalt von Rhodospirillaceae	54
5.4. Wasserstoff-Diffusion	55
5.5. Wasserstoff-Produktion in synthetischen Medien	57
5.5.1. Einfluß der Vorkultur auf Wasserstoff-Produktion und Wachstum	57
5.5.2. Abhängigkeit des Wasserstoff-Ertrages vom Wasserstoff-Donator	60
5.5.3. Abhängigkeit des Wasserstoff-Ertrages von der Lactatkonzentration	63
5.5.4. Abhängigkeit des Wasserstoff-Ertrages von der Bakterienkonzentration	64
5.5.5. Temperatur- und pH-Optimum der Rhodospirillaceae	66
5.5.6. Abbauprodukte	69
5.5.7. Wasserstoff-Produktion in semikontinuierlicher Kultur	71
5.5.8. Reaktivierung der Wasserstoff-Produktion nach Sauerstoff-Begasung	74
5.5.9. Wasserstoff-Produktion unter Freilandbedingungen	77
5.5.9.1. Einfluß der Dunkelphasen auf die Wasserstoff-Produktion	79
5.5.10. Wärmeproduktion von <u>Rs. rubrum</u> aus synthetischem Lactatmedium	80
5.6. Natürliche Medien	83
5.6.1. Molke	83
5.6.1.1. Abhängigkeit des Wasserstoff-Ertrages von der Vorkultur und der Molkekonzentration	84
5.6.1.2. Wasserstoff-Produktion aus Molke	89

	<u>Seite</u>
5.6.1.3. Wasserstoff-Produktion unter Freilandbedingungen	90
5.6.1.4. Wärmeproduktion von <u>Rs. rubrum</u> aus Molke	92
5.6.2. Buttermilch	94
5.6.3. Rübenzuckermelasse	95
5.6.3.1. Wasserstoff-Produktion aus Rübenzuckermelasse	97
5.6.3.2. Wärmeproduktion von <u>Rs. rubrum</u> aus Rübenzuckermelasse	99
5.6.4. Rohrzuckermelasse	101
5.6.4.1. Wasserstoff-Produktion aus Rohrzuckermelasse	102
5.6.4.2. Wärmeproduktion von <u>Rs. rubrum</u> aus Rohrzuckermelasse	104
5.6.5. Kartoffelfruchtwasser	105
5.6.5.1. Abhängigkeit des Wasserstoff-Ertrages von der Kartoffelfruchtwasserkonzentration	107
5.6.5.2. Wasserstoff-Produktion aus Kartoffelfruchtwasser	108
5.6.5.3. Wasserstoff-Produktion unter Freilandbedingungen	110
5.7. Chemischer Sauerstoffbedarf der natürlichen Medien	111
6. Diskussion	113
7. Zusammenfassung	132
8. Literatur	134

Abkürzungen und Maßeinheiten

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
c	Konzentration
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
d	Tag
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
dest.	destilliert
D-LDH	D-Lactatdehydrogenase
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
E	Extinktion, elektrische Feldstärke
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
f	folgende Seite
F	Fläche, Folgeelektrolyt
ff	folgende Seiten
ft ³	cubic foot
g	Gramm
h	Stunde
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
J	Joule
k	Kilo-
K	Kelvin
l	Liter
L	Leitelektrolyt
L-LDH	L-Lactatdehydrogenase
Lsg.	Lösung
lx	Lux
m	Meter, Ionenmobilität, Milli-
M	Molar
min	Minute
n	Nano-

NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
OD	Optische Dichte
p	Druck
Pa	Pascal
Rm.	Rhodomicrobium
Rp.	Rhodopseudomonas
Rs.	Rhodospirillum
S.	Seite
s.a.S.	siehe auch Seite
SKE	Steinkohleeinheiten
sp.	species
t	Zeit, Temperatur in °C, Tonnen
T	Temperatur in Kelvin
Tab.	Tabelle
Tm	Trockenmasse
UV	Ultraviolett
v	Volumen, Geschwindigkeit
V	Volt
W	Watt
μ	Mikro-
ΔG^0	Änderung der freien Energie unter Standardbedingungen.

1. Einleitung

Die Vorräte an fossilen Energieträgern sind begrenzt, insbesondere auf Erdöl und Erdgas wird man in absehbarer Zeit verzichten müssen. 1981 wurden Brennstoffe mit einem Energiegehalt von $1,1 \times 10^{16}$ kJ /1/ verbraucht. Im Jahr 2000 sollen es schon $1,5 \times 10^{16}$ kJ sein /2/.

Die abbaubaren, erschöpflichen Energiereserven der Erde schätzt man wie folgt ein /3/:

Kohle	2×10^{18} kJ,
Erdöl	4×10^{17} kJ,
Erdgas	2×10^{17} kJ,
Ölschiefer	4×10^{18} kJ,
Uran, nichtbrütende Reaktoren	2×10^{17} kJ.

Heute werden noch 96% der Energie aus fossilen und nicht erneuerbaren Energiequellen gewonnen /1/, doch wird der Erforschung regenerierbarer Energieträger immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt /1,5/.

- Wasserkraft,
- Wind- und geothermische Energie,
- Sonnenenergie und ihre Produkte wie Biomasse, Biogas, Alkohole, Wasserstoff usw.

hat die Wissenschaft neu entdeckt, um zukünftige Energieprobleme lösen zu helfen.

Bei der energetischen Nutzung des Sonnenenergieproduktes Biomasse sind grundsätzlich zwei Nutzungsbereiche zu unterscheiden:

- Die Erschließung und Nutzung bisher nicht genutzter Biomaspotentiale, insbesondere von Neben- und Abfallprodukten der Land- und Forstwirtschaft und der Lebensmittelindustrie und



- die gezielte Produktion und Aufbereitung nachwachsender Rohstoffe aus Land- und Forstwirtschaft z.B. Holz, Zucker, Stärke, Pflanzliche Öle und Fette usw. /1, 5/, wobei zu bedenken ist, daß die dafür benötigten landwirtschaftlichen Flächen der Nahrungsmittelproduktion verloren gehen.

Im Vordergrund des Interesses bei der Nutzung biologischer Produkte steht deshalb die Verwertung von Abfallstoffen und zellulosehaltigen Pflanzen.

Im Industrieland Bundesrepublik Deutschland erreichen Abfallprodukte eine Größenordnung von ca. 64 Millionen Tonnen organischer Trockensubstanz mit:

23,5	Mio t	Stroh,
14	Mio t	tierischer Ausscheidungen,
13	Mio t	Pflanzenmasse,
7	Mio t	Hausmüll,
4,5	Mio t	Holzabfällen.

Würden diese Mengen energetisch genutzt, käme das einer Primärenergieeinsparung von ca. 19 Mio t Steinkohleeinheiten (SKE) gleich, was einer Energiemenge von $5,6 \times 10^{14}$ kJ oder 5 % des heutigen Brennstoffbedarfs entspricht.

Für folgende Verfahren der Energiefreisetzung aus Biomasse gibt es derzeit Versuchs- und Demonstrationsanlagen in verschiedener Größe, in Planung und Bau bzw. Erprobung:

- Die Verbrennung von Biomasse ist technisch nur in Sonderfällen wie bei der Strohverbrennung gelöst. Die Emissionsvorschriften werden in der Regel noch nicht erfüllt.
- Die thermochemische Gaserzeugung (Vergasung, Pyrolyse). Die Entwicklungsarbeiten sind so weit fortgeschritten, daß mit der Projektierung von großtechnischen Anlagen begonnen werden könnte /2/.

- Äthanol aus Biomasse.

Durch den hohen Flächenbedarf für die Produktion der Biomasse und den Aufwand für Anbau, Ernte, Transport, Destillation und Entsorgung wurde in den großtechnischen Anlagen Brasiliens noch keine positive wirtschaftliche Bilanz erzielt /5/.

- Biogas aus Biomasse.

Die kleintechnische Erprobung in großem Maßstab führt die VR China durch /5/. In der Bundesrepublik Deutschland ist die Biogastechnik in größerem Umfang bisher lediglich zur Stabilisierung von Klärschlämmen kommunaler Klärwerke eingesetzt worden.

- Wasserstoff aus Biomasse.

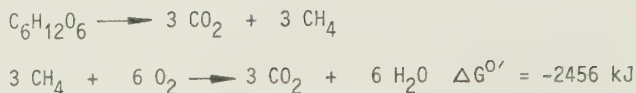
Die hier existierenden verschiedenen Verfahren sind alle dem Forschungsstadium noch nicht entwachsen, doch hat der Energieträger Wasserstoff gegenüber den vorhergenannten Energieträgern folgende Vorteile:

Wasserstoff kann besser als Verbrennungswärme oder Elektrizität über weite Strecken transportiert und ähnlich wie Erd- oder Biogas leicht gespeichert werden. Neue Speichersysteme, z.B. der Hydridspeicher, sind in der Erprobung /6/. Außerdem ist Wasserstoff ein Brennstoff, der an Umweltfreundlichkeit nicht zu übertreffen ist, denn das Verbrennungsprodukt ist nur Wasser.

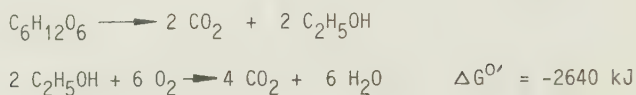
Wasserstoff wird in großer Reinheit direkt aus biotechnischen Prozessen gewonnen, ohne daß eine Destillation wie bei der Äthanolgewinnung nötig wäre.

Der aus einem Mol Glucose maximal gewinnbare Brennstoff Wasserstoff hat einen höheren Energiegehalt als das daraus gewonnene Methan oder Äthanol /7,8/:

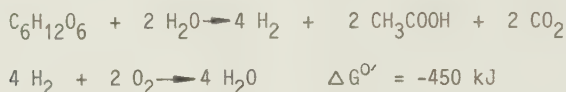
Methanproduktion:



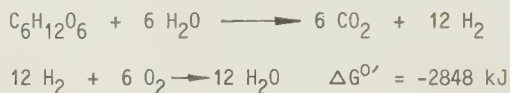
Athanolproduktion:



Wasserstoffproduktion aus anaerober Dunkelfermentation:



Wasserstoffproduktion mit Rhodospirillaceae:



Auf sein Gewicht bezogen hat Wasserstoff den höchsten Energiegehalt unter den Kraftstoffen. Er ist 2,7 x so groß wie der von Benzin /3/. Wasserstoff kann als Treibstoff in Verbrennungsmotoren oder Brennstoffzellen dienen /6, 9/.

Er kann als sauberes und leicht zu handhabendes metallurgisches Reduktionsmittel den Kohlenstoff und seine Verbindungen vertreten, z.B. in der eisenschaffenden Industrie /10/.

Wasserstoff wird bei der Ammoniaksynthese verwendet. Schon heute geht ein Drittel des gegenwärtigen Wasserstoffbedarfes in die Düngemittelproduktion.

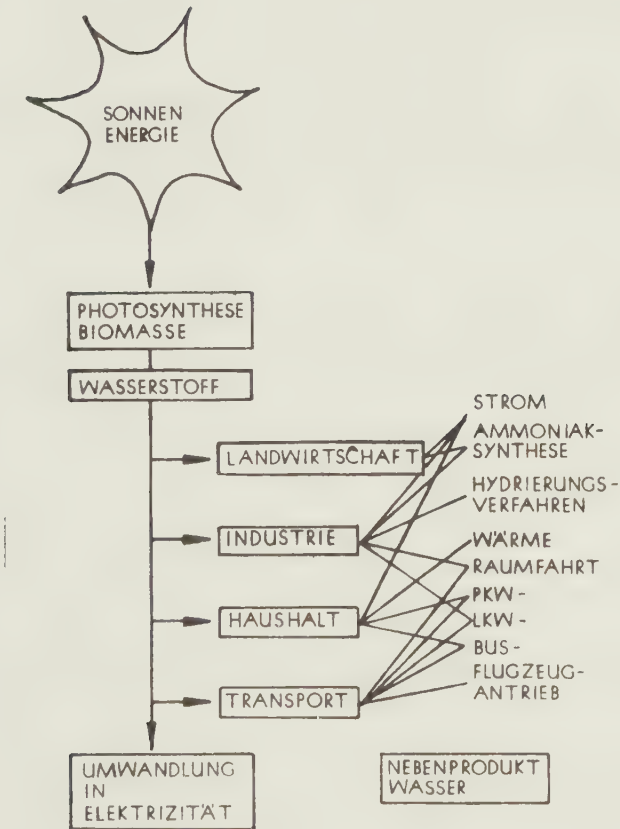


Abb. 1: Verwendungsmöglichkeiten des Wasserstoffs /3/.

Die Fähigkeit, molekularen Wasserstoff freizusetzen, besitzen nur einige Bakterien- und Algenarten.

Sie unterscheiden sich bei der Wasserstoffproduktion durch ihre Energie- und Kohlenstoffquelle, sowie im Sauerstoffbedarf.

Folgende Verfahren sind hier bekannt:

- Im anaeroben, fermentativen Dunkelprozeß produziert z.B. Clostridium butyricum maximal 4 Mole Wasserstoff aus 1 Mol Glucose (s.a.S.4). Als Energie- und Kohlenstoffquelle dient organisches Substrat. Gegenüber möglichen anderen Verfahren ist der Ertrag zu gering /4/.
- In einer aeroben, phototrophen Phase erzeugt z.B. das Blaubakterium Nostoc muscorum als Folge der Photolyse des Wassers einen noch unbekannten Wasserstoffdonator, der in einer künstlich einzuleitenden anaeroben, phototrophen Phase vom Nitrogenase-Enzymkomplex katalysiert den molekularen Wasserstoff freisetzt. Dabei wird das Photosystem II inhibiert. Nach 15 Stunden muß die Wasserspaltung und damit die Sauerstoffproduktion wieder künstlich in Gang gesetzt werden. N. muscorum stellt die Wasserstoffproduktion ein und erzeugt wieder den endogenen Wasserstoffdonator. Das regelmäßige Aussetzen der Wasserstoffproduktion schmälert den Ertrag beträchtlich. Es werden ca. 1l Wasserstoff pro 1 Kultursuspension und Tag produziert /11/.
- Zellfreie Systeme bestehend aus Chloroplasten, Ferredoxin und Hydrogenase erzeugen ähnlich wie Blaubakterien durch Inhibierung des Photosystems II molekularen Wasserstoff. Dabei wird die Wasserspaltung, also die Sauerstoffproduktion, unterbunden, um das Enzymsystem nicht zu schädigen. Trotzdem sind zellfreie Systeme noch anfälliger gegen Sauerstoffeinbrüche, da die Hydrogenase frei und nicht wie z.B. bei N. muscorum in Heterocysten eingeschlossen vorliegt. Als Energiequelle dient, ebenso wie bei den Blaubakterien, das Sonnenlicht, als Kohlenstoffquelle Kohlendioxid.

Die Selbstreproduktion des wasserstofferzeugenden Systems, ein großer Vorteil der biologischen Energiegewinnung, ist in einem künstlichen System natürlich ausgeschlossen.

- Im anaeroben, phototrophen Prozeß erzeugt z.B. Rhodospirillum rubum, eine Rhodospirillaceae-Art, aus 1 Mol Glucose als Wasserstoffdonator maximal 12 Mole molekularen Wasserstoff (s.a.S.4). Als Energiequelle dient das Sonnenlicht, als Kohlenstoffquelle ebenfalls das organische Substrat. Daß in diesem Prozeß kein Wasser gespalten, sondern organisches Material verwertet wird, wird vielfach als Nachteil angesehen /4/.

Dieser Nachteil kann sich aber zum Vorteil verkehren, wenn es gelingt, Wasserstoff in größeren Mengen aus Abwässern oder Lebensmittelnebenprodukten freizusetzen und so die Abfallaufbereitung mit der Energieproduktion zu verbinden.

2. Fragestellung

Die Tatsache, daß Rhodospirillaceae unter anaeroben Bedingungen organische Substanzen im Licht unter Wasserstoff-Entwicklung abzubauen vermögen, läßt sie als Mikroorganismen für die Wasserstoff liefernde Aufbereitung organischer Abfälle unter direkter Einbeziehung von Sonnenenergie besonders geeignet erscheinen.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Rhodospirillaceae-Art organische Reststoffe mit dem höchsten Wasserstoff-Ertrag abbaut, außerdem die Frage, ob die Nichtbedürftigkeit an Vitaminen von Rp. acidophila, Rm. vannielii und Rs. tenue diesen eine höhere Wasserstoff-Produktion ermöglicht als Rp. capsulata oder Rs. rubrum, die Wachstumsfaktoren benötigen und deshalb unter Umständen in Mangelmedien benachteiligt sind.

Da eine technische Wasserstoff-Gewinnung aus Lactat, das von allen Rhodospirillaceae gut verwertet wird, wegen des hohen Preises unwirtschaftlich wäre, wurden für die Untersuchungen Lebensmittelnebenprodukte ausgewählt, die keinen Ammoniak und wenig Aminosäuren enthalten, um die Gasproduktion nicht zu beeinträchtigen (s.a.S.14) und das Wachstum zu begrenzen. Weiter sollte untersucht werden, in welcher Konzentration die Substrate die höchste Ausbeute erbringen und ob ihnen für eine optimale Umsetzung Vitamine oder Spurenelemente fehlen.

Ein Vergleich der Wasserstoffproduktion in Labor- und Freilandversuchen sollte die Reduktion der Erträge und die Verlangsamung der Gasfreisetzung durch Witterungseinflüsse und Tag-Nacht-Wechsel aufzeigen.

Durch Simulation von Störungen des Produktionsprozesses wie Lichtmangel und Lufteinbrüche war die Reaktivierbarkeit der Wasserstofferzeugung zu prüfen.

In den als Substrat verwendeten Abwässern müßte sich nach der Behandlung mit Rhodospirillaceae ein Reinigungseffekt nachweisen lassen, da die Bakterien einen großen Teil des organischen Materials zu Wasserstoff und Kohlendioxid abbauen. Die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfes (CSB) vor und nach dem Einsatz der Bakterien sollte die Klärung belegen.

Zusammenfassend sollte durch Abschätzung des zu erwartenden Energieertrages und des damit verbundenen Aufwands aufgezeigt werden, ob der Verwertung von Lebensmittelnebenprodukten durch Rhodospirillaceae im technischen Maßstab Chancen einzuräumen sind.

3. Material

Am Beispiel folgender Stämme aus der Familie der Rhodospirillaceae:

<u>Rhodopseudomonas capsulata</u> ,	DSM 152,
<u>Rhodopseudomonas acidophila</u> ,	DSM 137,
<u>Rhodomicrobium vannielii</u> ,	DSM 162,
<u>Rhodospirillum tenue</u> ,	DSM 109,
<u>Rhodospirillum rubrum</u> ,	DSM 467,

soilen die Bedingungen der photobiologischen Wasserstoffproduktion geprüft werden. Rp. acidophila, Rm. vannielii und Rs. tenue wurden für die Untersuchungen ausgewählt, da sie, im Gegensatz zu Rp. capsulata und Rs. rubrum, keinerlei Wachstumsfaktoren benötigen. Die Wasserstofferträge von Rp. capsulata und Rs. rubrum, die Thiamin, Biotin und Nicotinsäure bzw. nur Biotin zum Wachsen brauchen, werden mit denen der anderen Stämme verglichen /12/.

In der Natur kommen Rhodospirillaceae in stehenden Gewässern, sowohl in Süß- als auch in Salzwasser, vor /12/, in Tiefen, in denen das Maximum der spektralen Energieverteilung bei 450 - 500 nm liegt /13, 14/, was mit dem Absorptionsmaximum ihrer Carotinoide übereinstimmt /15/.

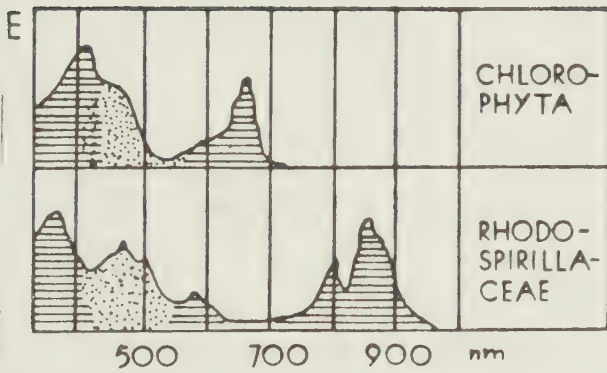


Abb. 2: Vergleich der Absorptionskurven ganzer Zellen von Grünalgen und Purpurbakterien /13/.



Chlorophyll bzw. Bakterienchlorophyll



Carotinoide

Neben den Carotinoiden zeigt die Absorptionskurve intakter Rhodospirillaceae-Zellen ein Maximum zwischen 830 und 890 nm, für das das Bakterienchlorophyll a verantwortlich ist, ebenso wie für das Maximum im kurzwelligen Licht bei 300 - 400 nm /12/. Rhodospirillaceae sind je nach ihrem Gehalt an Photosynthesepigmenten purpur, rot, orange, braun oder grünlich gefärbt /12/.

Wachstum und Vermehrung können durch autotrophe, litotrophe oder heterotrophe Bedingungen aufrechterhalten werden.

Rhodospirillaceae sind:

1. bezüglich der verwendeten Energiequelle durch Verwendung elektromagnetischer Strahlung phototroph oder heterotroph, wenn organische Substrate die Energiequelle bilden /16, 17/,
2. lithotroph oder organotroph, je nach verwerteter Wasserstoffquelle /13, 17, 18/,
3. sowohl autotroph durch Kohlendioxid-Fixierung als auch heterotroph mit organischen Kohlenstoffquellen /16, 17/,
4. Assimilierer von Luftstickstoff und organisch gebundenem Stickstoff.
5. Sie entwickeln sich unter anaeroben und aeroben Bedingungen /19/, wenn elektromagnetische Strahlung als Energiequelle zur Verfügung steht. Dienen organische Substanzen als Energiequelle, ist eine Entwicklung nur unter aeroben bis mikroaerophilen Bedingungen möglich /14, 17, 20/.

Die untersuchten Rhodospirillaceae-Arten unterscheiden sich in ihrer Substratverwertung:

R. capsulata verwertet:

Fettsäuren bis zum Pelargonat, einen Teil von Zwischenprodukten

des Tricarbonsäure-Zyklus, Fructose, Glucose und eine Reihe von Aminosäuren, ebenso wie molekularen Wasserstoff.

Nicht verwertet werden:

Citrat, Äthanol, Gluconat, Glycerol, Mannitol, Mannose, Sorbitol, Tartrat, Leucin, Sulfid, Thiosulfat.

R. acidophila verwertet:

Acetat, Butyrat, Äthanol, Fumarat, Lactat, Malat, Propionat, Pyruvat, Succinat, Valerat und molekularen Wasserstoff.

Nicht verwertet werden:

Benzoat, Caprylat, Format, Glycerol, Pelargonat, Zucker und Zuckeralkohole, Glutamat und andere Aminosäuren, Sulfid und Thiosulfat.

R. vanniellii verwertet:

Acetat, Butanol, Butyrat, Caproat, Äthanol, Fumarat, Lactat, Malat, Propanol, Propionat, Succinat, Valerat und molekularen Wasserstoff.

Nicht verwertet werden:

Citrat, Format, Fructose, Glucose, Mannitol, Mannose, Tartrat, Sulfid und Thiosulfat.

R. tenue verwertet:

Acetat, Arginin, Butyrat, Caproat, Caprylat, Aminosäuren des Caseins (casamino acids), Fumarat, Lactat, Malat, Pelargonat, Propionat, Pyruvat, Succinat, Valerat und molekularen Wasserstoff.

Nicht verwertet werden:

Citrat, Äthanol, Glycerol, Malonat, Zucker und Zuckeralkohole und Thiosulfat.

R. rubrum verwertet:

Fettsäuren, die meisten Zwischenprodukte des Tricarbonsäure-Zyklus, Äthanol, Alanin, Asparat, Glutamat, Fructose und molekularen Wasserstoff.

Nicht verwertet werden:

Citrat, Gluconat, Tartrat, Zucker außer Fructose und Zuckeralkohole, Sulfid und Thiosulfat /12/.

Wasserstoff erzeugen die verschiedenen Rhodospirillaceae-Arten aber nur, wenn die Kohlenstoffquelle organisch ist und zusätzlich anaerobe Bedingungen und Licht geeigneter Wellenlänge (s.o.) vorhanden sind.

3.1. Nitrogenase-Enzymkomplex und Wasserstoffproduktion

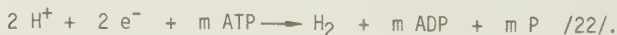
Einige Organismen, unter ihnen Rhodospirillaceae, können Luftstickstoff binden, zu Ammoniak als erstem stabilen Stoffwechselprodukt reduzieren und so den Kreislauf des Stickstoff in der Biosphäre schließen.

Verantwortlich für den elektronenübertragenden Schritt nach der Gleichung



ist das Enzym Nitrogenase.

Die Spezifität des Enzyms ist allerdings gering, so daß bei Abwesenheit seines physiologischen Substrates N_2 und ohne Endprodukthemmung durch Ammoniak Protonen reduziert und Wasserstoff freigesetzt wird:



Nitrogenase besteht aus zwei Proteinen, einem Eisen- und einem Molybdän-Eisenprotein mit dem Molekulargewicht von ca. 60 000 Dalton und 220 000 Dalton.

An das Zweite wird das zu reduzierende Substrat, N_2 , H^+ oder auch N_3^- , N_2O oder Acetylen, an das Erste Mg-ATP gebunden /21/.

Neben der Sauerstoffempfindlichkeit erwähnt Weaver die Kälteempfindlichkeit des Enzyms /21/.

Das für die Nitrogenasereaktion notwendige ATP wird bei den Rhodospirillaceae durch den zyklischen Elektronentransport verbunden mit der Phosphorylierung von ADP bereitgestellt /23/.

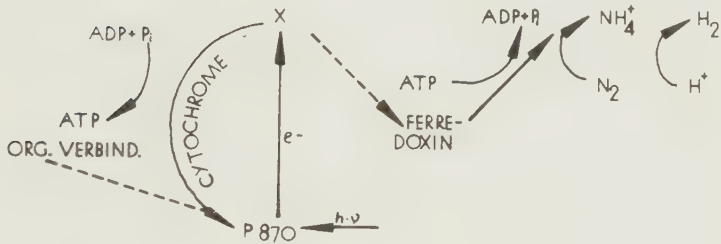


Abb. 3: Lichtgetriebener Elektronentransport und zyklische Phosphorylierung in Rhodospirillaceae /nach 21/.

Ob auch ein nicht-zyklischer Elektronentransport über Ferredoxin bzw. NAD^+ zum Endakzeptor H^+ oder N_2 führt, ist umstritten. Einige Autoren postulieren einen energiegetriebenen rückläufigen Elektronentransport zur Reduktion von NAD^+ /21, 24/.

Physiologische Elektronendonatoren für die Rhodospirillaceae sind die genannten organischen Verbindungen und molekularer Wasserstoff.

Die Bildung des gasförmigen Wasserstoffs erfolgt im Licht unter Mitwirkung des photosynthetisch gebildeten ATP durch Oxidation des im Tricarbonsäure-Zyklus reduzierten NAD^+ /25/.

Glucose wird im Entner-Doudoroff-Weg, Fructose über den Embden-Meyerhof-Weg abgebaut /29/.

Der in den Zyklus eingehende Acetylrest wird unter wiederholter Abspaltung von Wasserstoff und Kohlendioxid vollständig abgebaut, so daß am Ende Oxalessigsäure regeneriert wird. Die Oxidation erfolgt nicht durch elementaren Sauerstoff, der unter anaeroben Bedingungen ohnehin nicht vorhanden ist, sondern sie folgt dem Wielandschen Dehydrierungsschema, d.h. es wird Wasser angelagert und anschließend Wasserstoff abgespalten. Die H-Atome werden von NAD^+ übernommen und unter ATP-Verbrauch, von der Nitrogenase katalysiert, als molekularer Wasserstoff freigesetzt /14, 26 /.

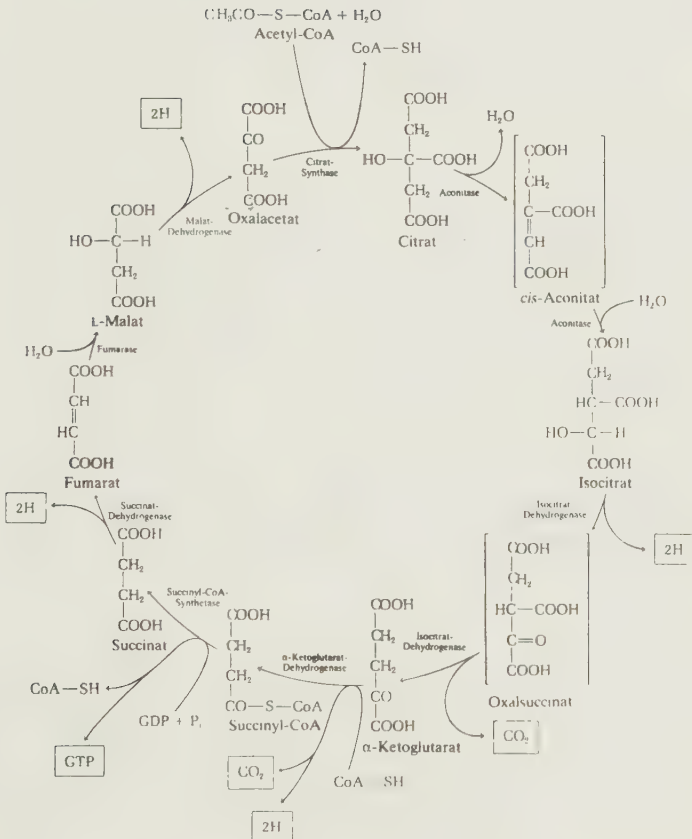


Abb. 4: Citrat-Zyklus und Wasserstoff-Produktion.

Erläuterungen im Text /28/.

Organische Verbindungen, u.a. Glucose, können unter bestimmten Voraussetzungen durch Glykolyse und den Tricarbonsäure-Zyklus vollständig zu Kohlendioxid und Wasserstoff abgebaut werden /12, 25/.

Dabei stammt die Hälfte des freigesetzten molekularen Wasserstoffs aus dem Wasser /27/, so daß sich für Glykolyse und Tricarbonsäure-Zyklus folgende Gesamtbilanz ergibt:



3.2. Vorkulturmedien

Zur schnellen Heranzüchtung von Rhodospirillaceae-Biomasse wurden verschiedene Vorkulturmedien verwendet, deren Rezepturen leicht verändert von Hillmar /37/, Weaver /20/ und Drews /38/ übernommen wurden:

Zusammensetzung der Kulturmedien:

1. Lactat	3,6	g
Glutamat	1,03	g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,075	g
KH ₂ PO ₄	0,6	g
K ₂ HPO ₄	0,9	g
Thiamin	1	mg
p-Aminobenzoesäure	0,2	mg
Nicotinsäure	1	mg
Aqua dest. ad	1000	ml

2. Wie 1., aber 2,5 g Malat/l anstelle des Lactats.

3. Wie 1., aber 2,5 g Malat/l anstelle des Lactats und 0,2 g Hefeextrakt für Rp. acidophila und Rm. vanniellii bzw. 1 g/l für Rp. capsulata, Rs. rubrum und Rs. tenue anstelle der Vitamine.

Zusammensetzung der Spurenelementelösung:

EDTA	0,8 g	LiCl	0,5 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	10 mg	SnCl ₂ · 2 H ₂ O	0,5 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	4 mg	H ₃ BO ₃	1 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	1,6 mg	KBr	2 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	3 mg	KJ	2 mg
ZnCl ₂	2 mg	BaCl ₂	0,5 mg
Aqua dest ad 1000 ml, 40 ml/l Kulturmedium.			

3.3. Hauptkulturmedien

Bei den Untersuchungen an Rhodospirillaceae wurden verschiedene synthetische und natürliche Nährlösungen verwendet, die sich in der Zusammensetzung dadurch unterscheiden, daß sie aus chemisch reinen Einzelsubstanzen bzw. aus komplexen Substraten der Lebensmittelproduktion gewonnen wurden.

3.3.1. Synthetische Medien

Die synthetischen Hauptkulturmedien unterscheiden sich vom Vorkulturmedium Nr. 1 nur durch eine Variation der Kohlenstoff- und Wasserstoffquelle. Folgende Wasserstoff-Donatoren wurden untersucht:

1. Acetat,
2. Lactat,
3. Malat,
4. Fructose,
5. Glucose,
6. Saccharose.

3.3.2. Natürliche Medien

Da eine technische Wasserstoff-Gewinnung mit Rhodospirillaceae aus synthetischen Medien wegen des hohen Preises der chemisch reinen Substanzen auf jeden Fall unwirtschaftlich wäre, wurde nach preiswerten Abfallstoffen bzw. Nebenprodukten der Lebensmittelverarbeitung gesucht, die aus einfachen organischen Verbindungen bestehen und von Rhodospirillaceae abgebaut werden können (S.12 ff). Purpurbakterien verwerten Polysaccharide, langkettige Fettsäuren, Proteine, Holz usw. nicht ohne spezielle Vorbehandlung des Substrats. Deshalb wurden folgende Lebensmittelnebenprodukte für die Untersuchungen ausgewählt:

3.3.2.1. Molke

Da in Berlin Milch nicht zu Käse verarbeitet wird, mußte die Molke selbst hergestellt werden.

- a. Frischmilch mit 1,5 % Fett und
- b. H-Milch mit 1,5 % Fett

wurden mit Labferment von J. Hausers Nachfah. KG, Ottmarshausen zur Käsefällung behandelt. Nach dem Abzentrifugieren des Käses blieben aus ursprünglich 1000 ml Milch ca. 850 ml milchig trübe Molke mit einem pH von 6,45 zurück. Die Trübung konnte durch Ausschütteln mit Äther nicht beseitigt werden, dagegen mit Ammonsulfat. Eine zweimalige Behandlung mit Perchlorsäure und anschließender Neutralisierung mit 2 N Kalilauge klärte die Molke vollständig. Es handelt sich bei der Trübung also nicht um Fett, sondern um Protein.

In den Untersuchungen der Wasserstoff-Produktion aus Molke wurde die oben beschriebene Klärung nicht vorgenommen, um den Prozeß so unkompliziert wie möglich zu gestalten.

3.3.2.2. Rübenzuckermelasse

Rübenzuckermelasse, der letzte Ablauf, der nach mehrmaliger Kristallation von Zucker anfällt, enthält noch erhebliche Mengen Restzucker und müßte deshalb ein wertvolles Substrat zur Wasserstoff-Gewinnung mit Hilfe von Rhodospirillaceae sein.

Substanzen	[%]
Saccharose	48,5
Raffinose	1,0
Invertzucker	1,0
Organische Nichtzucker-Substanzen	20,7
Stickstoff	1,2 - 20
Asche	10,8
Wasser	18,0

Tab. 1 : Durchschnittliche Zusammensetzung der
Rübenzuckermelasse / 43 /.

Je nach Rübenstandort und Jahr verändert sich die Zusammensetzung der Melasse oft erheblich.

Wenn nicht anders vermerkt, wurde die Melasse bei allen Untersuchungen in einer Konzentration von 1 : 79 mit destilliertem Wasser verwendet.

3.3.2.3. Rohrzuckermelasse

Rohrzuckermelasse unterscheidet sich von Rubenzuckermelasse hauptsächlich durch einen niedrigeren Saccharose- und höheren Invertzuckergehalt:

Substanzen	[%]
Saccharose	53,4
Raffinose	--
Invertzucker	21,2
Organische Nichtzucker-Substanzen	19,6
Stickstoff	0,5
Asche	9,8
Wasser	16,0

Tab. 2 : Durchschnittliche Zusammensetzung der
Rohrzuckermelasse / 43, 44 /.

Storende Substanzen, die besonders auch in Rohrzucker-
melassen in großer Menge vorkommen können, sind vor
allem schweflige Säuren, Hydroxymethylfurfurol, Mangan-
und Eisensalze u.a.. Für viele Fermentationen, z.B. zur
Backhefeherstellung und zur Citronensäureproduktion,
hat sich Rohrzuckermelasse als nur bedingt oder als unge-
eignet erwiesen /43/.

3.3.2.4. Kartoffelfruchtwasser

Kartoffelfruchtwasser fällt in großen Mengen bei der Kartoffelstärkeproduktion als Nebenprodukt an. Dieses Wasser kann als Wasserstoff-Donator für Rhodospirillaceae verwendet werden, da es, wie mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und der Zuckerbestimmung nach Luff-Schorl festgestellt wurde, 0,9 % Glucose und Fructose enthält.

Für die Laboruntersuchungen wurde Kartoffelfruchtwasser wie folgt hergestellt:

2,5 kg Kartoffeln der Handelssorte "Hansa, festkochend" wurden geschält, im Entsafter zerkleinert und das Fruchtwasser abgetrennt. Die restliche ungelöste Stärke und Fruchtteile wurden danach bei 3500 UPM 20 Minuten abzentrifugiert, der Überstand anschließend filtriert. Aus 2,5 kg Kartoffeln wurden ca. 1 l Kartoffelfruchtwasser gewonnen.

4. Methoden

4.1. Kulturgefäße

Es wurden verschiedene Kulturgefäße auf ihre Eignung zur Anzucht und Aufbewahrung von Rhodospirillaceae am Beispiel von Rp. capsulata untersucht:

1. Erlenmeyerkolben verschiedener Größe,
2. 2-l-Standard-Glasfermenter,
3. 5,5-l-Glasflaschen,
4. Eigenbau-Röhrenfermenter mit einem Fassungsvermögen von je 410 ml und
5. Reagenzgläser mit einem Volumen von je 110 ml.

Daß Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen über 1000 ml, der Fermenter und die Glasflasche für die Rhodospirillaceae-Kultur ungeeignet waren, zeigte sowohl der Wasserstoff-Ertrag als auch das Verhalten der Bakterien selbst.

Aus einem 2-l-Erlenmeyerkolben wurden 15 %, aus dem 2-l-Fermenter 39 % und aus der 5,5-l-Flasche 0,1 %, des Substrat-Wasserstoff als Gas freigesetzt.

Das bewegliche Rp. capsulata war nicht gleichmäßig im Medium verteilt, sondern heftete sich fest an die vom Licht direkt getroffenen Glaswände. Auch Göbel /45/ beschreibt dieses Phänomen und führt es auf Lichtmangel im Inneren des Kulturgefäßes zurück.

Bei den Reagenzgläsern und Röhrenfermentern mit einer Schichtdicke von nur 3,0 cm bzw. 2,9 cm wurde die Anheftung der Bakterien an die Gefäßwand nicht beobachtet. Der Wasserstoff-Ertrag lag maximal bei 86 % im Reagenzglas und bei 66 % im Röhrenfermenter. Obwohl die Durchstrahlung der Medien in

beiden Gefäßen ungefähr gleich war, schnitt der Röhrenfermenter bei der Wasserstoff-Produktion wesentlich schlechter ab. Denn seine Länge von 70 cm erschwerte die gleichmäßige Durchmischung des Substrats, und das Nachstellen des pH-Werts erwies sich im laufenden Batch-Betrieb als unmöglich. Vom einen Ende der Röhre, dem Einspritzpunkt der Säure oder Lauge bis zum anderen Ende baute sich ein pH-Gradient auf, der sich wegen der vollständigen Füllung des Gefäßes, die wiederum zur Herstellung der anaeroben Verhältnisse nötig war, nicht beseitigen ließ. So wurde der optimale pH-Wert nur in einem kleinen Abschnitt des Fermenters erreicht, während in den größeren Teilen der Röhre eine für die Wasserstoff-Produktion ungünstige Wasserstoffionenkonzentration herrschte (s.a.S.68).

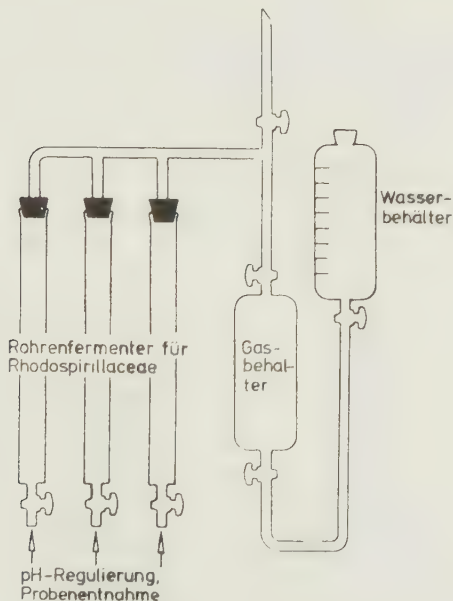


Abb. 5: Schematische Darstellung des Eigenbau-Röhrenfermenters nach Rechenberg /46, verändert./.

Das 110 ml fassende Reagenzglas erwies sich im Laborbetrieb als günstigste Gefäßform und wurde, wenn nicht anders beschrieben, für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt.

4.2. Versuchsaufbau

Die Rhodospirillaceae wurden in 110 ml fassenden Reagenzgläsern im Wasserbad kultiviert, von einer Einhängekühlung auf einer konstanten Temperatur von 303 ± 1 K gehalten. Das entstehende Gas wurde mit einem Schlauchsystem über eine Wasserwanne in einen graduieren mit Wasser gefüllten Auffangbehälter geleitet, wo es das Wasser verdrängte und so volumetrisch gemessen werden konnte. Das gleichzeitig mit dem Wasserstoff entstehende Kohlendioxid löste sich dabei fast vollständig im Wasser, so daß das aufgefangene Gas zu 90 bis 100 % aus Wasserstoff bestand /14, 37/:

	Rp. capsulata	Rm. vannielii	Rs. rubrum
H ₂	89,4	91,2	90,0
N ₂	6,3	6,6	5,8
CO ₂	2,9	1,1	2,0
O ₂	0,82	0,67	1,1
CO	0,24	0,27	0,23
Ar	0,1	0,09	0,11
C ₂ H ₄	0,03	0,09	0,02
CH ₄	0,004	0,006	0,004
C ₃ H ₆	0,001	0,001	0,001
C ₄ H ₈	0,001	0,001	0,001
C _x H _y	0,001	0,001	0,001
H ₂ O	0,21	0,17	0,08

Tab. 3 : Massenspektrometrische Gasanalyse ausgewählter Rhodospirillaceae in Mol %, durchgeführt von der Fa. Siemens Erlangen.

Die gemessenen Gasvolumen wurden auf Normalbedingungen von $1,013 \times 10^5$ Pa, 273 K und 0 % Gasfeuchtigkeit reduziert. Dazu wurde die allgemeine Zustandsgleichung der Gase verwendet /47/ :

$$V_0 = V_1 \frac{p_1 - f}{p_0} \times \frac{T_0}{T_1}$$

- V_0 Gasvolumen unter Normalbedingungen [ml]
 V_1 gemessenes Gasvolumen [ml]
 p_0 Luftdruck unter Normalbedingungen [Pa]
 p_1 gemessener Luftdruck [Pa]
 f Sättigungsdruck des Wasserdampfes bei T_1
 T_0 Temperatur unter Normalbedingungen [K]
 T_1 gemessene Temperatur [K]

Beleuchtet wurden die Rhodospirillaceae im Laborbetrieb mit 40 W Glühlampenlicht.

Die gewünschten anaeroben Bedingungen stellten sich durch randvolles Auffüllen der Kulturgefäße mit der Bakterien-suspension und durch Assimilation des gelösten Sauerstoffs ein.

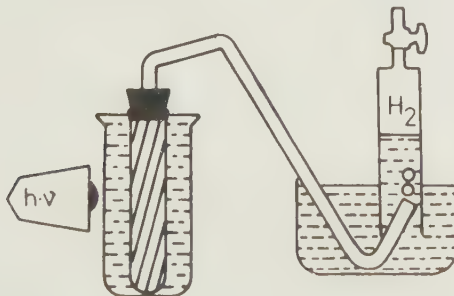


Abb. 6 : Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.
Erläuterungen im Text.

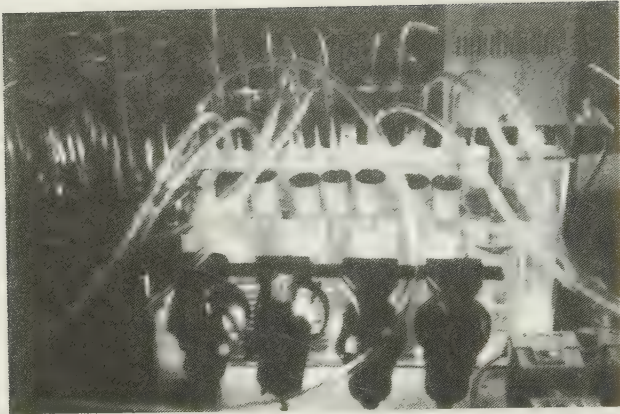


Abb. 7 : Versuchsaufbau. 16 Kulturgefäße im beleuchteten und gekühlten Wasserbad. Links im Bild die Gasauffangbehälter.

Neben der oben beschriebenen Batch-Kultur wurde auch eine semikontinuierliche Kultur durchgeführt. Der Versuchsaufbau wurde dazu wie folgt abgeändert:

Die in den Reagenzgläsern kultivierten Rhodospirillaceae wurden nach dem Aufhören der Gasproduktion nicht verworfen, sondern bei $4000 \times g$ 40 Minuten abzentrifugiert und in frischer synthetischer Nährlösung resuspendiert, so daß die Bakterienmasse erhalten blieb.

4.3. Vorkultur der natürlichen Medien

Um den Wasserstoff-Ertrag zu erhöhen, wurden alle natürlichen Medien, Molke, Rüben- und Rohrzuckermelasse und Kartoffelfruchtwasser, einer Vorkultur mit dem homofermentativen Milchsäurebakterium

Lactobacillus bulgaricus

zur Umwandlung des Zuckers in Milchsäure unterzogen.
Das Substrat Molke wurde auch mit dem Milchsäurebakterium

Lactobacillus plantarum

vorkultiviert.

Bei einer Inkubationstemperatur von 315 K und einer ständigen Neutralisation der Molke mit ca. 1 N Natronlauge konnte die Säureproduktion und damit die Vorkultur nach drei Tagen abgeschlossen sein. Je nach Konzentration der verwendeten Lauge wurde das Substrat um 20 bis 50 % verdünnt.

4.4. Freilandversuche

Für einige Substrate wurden mit Rhodospirillaceae neben Laboruntersuchungen auch Freilandversuche durchgeführt, die Anhaltspunkte über die Ertragsreduzierung und Verlangsamung der Wasserstoff-Produktion durch Witterungseinflüsse und Tag-Nacht-Wechsel für einen möglichen technischen Einsatz der Bakterien geben sollten.

Alle "Freilandversuche" wurden im Zeitraum zwischen April und August auf einem Flachdach durchgeführt.

Die Versuchsbedingungen wurden, wie unter "Versuchsaufbau" beschrieben, beibehalten. Nur die Energiequelle Glühlampenlicht wurde durch die Sonne ersetzt, indem die Kulturgefäße in südwestlicher Richtung ausgerichtet wurden. Die kontinuierliche Beleuchtung wurde damit in eine periodische geändert.

4.5. Manometrie

Der Gasaustausch der Rhodospirillaceae, Wasserstoff- und Kohlendioxid-Produktion, Stickstoff-, Kohlendioxid- und Sauerstoff-Aufnahme wurden neben der unter "Versuchsaufbau" beschriebenen Meßmethode auch manometrisch gemessen. Die manometrischen Techniken basieren auf dem Gasgesetz:

$$p \cdot V = n \cdot R \cdot T$$

wobei

p Druck

V Volumen

n Anzahl der Mole Gas

T Temperatur

R allgemeine Gaskonstante

sind. Durch Konstanthalten dreier Variabler zeigt die Änderung der vierten eine Änderung im System an.

4.5.1. Manometrie nach Warburg

Ändert sich in einem geschlossenen, isothermen und isochoren System bei der Aufnahme oder Abgabe eines Gases der Druck, so verhält sich diese Änderung proportional zum Volumen des umgesetzten Gases:

$$x = k \cdot h$$

wobei

x umgesetzte Gasmenge [μl]

h gemessene Druckänderung [mm Brodielsg.]

k Gefäßkonstante [$\mu\text{l/mm}$]

sind.

Die Gefäßkonstante k ist abhängig von der Temperatur, dem Volumen des mit dem Manometer verbundenen Reaktionsraumes und vom Volumen der flüssigen Phase, die die Rhodospirillaceae enthält und in der sich die Gase lösen:

$$k = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_{fl} \cdot \alpha}{p_0}$$

wobei

α Bunsenscher Absorptionskoeff. d. Gases,
 V_g Volumen des Gasraumes [μ l],
 T Versuchstemperatur [K],
 V_{fl} Volumen der flüssigen Phase [μ l],
 p_0 Normaldruck von $1,03 \times 10^5$ Pa $\approx$ 10 000 mm
BrodieLösung

sind.

4.5.2. Manometrie nach Gilson

Ändert sich in einem geschlossenen, isothermen und isobaren System bei der Aufnahme oder Abgabe eines Gases das Volumen, so entspricht diese Änderung dem Volumen des umgesetzten Gases.

Bei der Gilson-Manometrie entfällt die Berechnung der Gefäßkonstanten, da die Gasmengen direkt angezeigt werden.

Für alle manometrischen Untersuchungen wurden die Standard-Warburggefäße mit einem Zentralbehälter und einer Seitenbirne verwendet.

Der Hauptraum enthielt 3 bis 5 ml Bakteriensuspension mit einer Bakterienkonzentration von 1 bis 3 mg Tm/ml in synthetischem Lactat-Medium mit oder ohne Glutamat.

Das bei der Atmung und Gärung entstehende Kohlendioxid wurde vom im Zentralbehälter auf einem Faltenfilter befindlichen KOH (0,2 ml 2 N KOH) absorbiert, um den Verbrauch oder die Produktion anderer Gase messen zu können. Die CO_2 -Produktion wurde aus der Differenz der Gasumsätze mit und ohne KOH errechnet.

Die Gefäße wurden bei 303 K im Wasserbad geschüttelt und mit 40 W Glühlampenlicht beleuchtet. Bei der Warburg-Manometrie wurden die Leuchten synchron mit den Systemen bewegt, bei der Gilson-Manometrie wurden die Gefäße über eine Reihe feststehender Leuchten hinweggeführt.

Um die Wasserstoff-Produktion zu starten, wurde die im Reaktionsraum über dem Nährmedium stehende Luft durch 10 minütiges Begasen mit Argon ausgetrieben. Gestoppt wurde die Wasserstoff-Erzeugung durch eine 10 minütige Begasung mit reinem Sauerstoff.

Die Argon-Sauerstoff-Gemische 1 : 1 und 2 : 1 wurden nach 10 Minuten Argonbegasung und 3,5 Stunden Inkubationszeit 10 Minuten lang mit einem Gasfluß von 2 x 600 ml/min bzw. 600 und 300 ml/min wie die anderen Gase über die Schornsteine in die in Reihe geschalteten Reaktionsgefäße geleitet. Nach den Begasungen wurden die Schornsteine geschlossen und die Manometer justiert.

4.6. Optische Messungen

4.6.1. Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte der Bakteriensuspensionen wurde mit einem einstrahligen Zeiss Spektralphotometer PM2D bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen. Um den Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen-Gesetzes nicht zu verlassen,

wurden die am häufigsten in den Versuchen eingesetzten Bakteriendichten von 0,5 bis 7,0 OD₆₆₀ für die photometrische Messung um 1 : 15 mit 0,01 N Phosphatpuffer verdünnt und gegen eine Referenzküvette mit Phosphatpuffer gemessen. Angegeben wurden die Bakterienkonzentrationen aber in der Regel als Trockenmasse in mg pro ml Bakterien-suspensionen, für die Kalibrierungskurven jeder untersuchten Rhodospirillaceae-Art angefertigt wurden.

Die bei der Messung der optischen Dichte auftretenden Fehler der Lichtstreuung an den Bakterienzellen und der phototaktischen Bewegung der Rhodospirillaceae in Richtung des Meßstrahls wurden gemildert oder aufgehoben durch eine gleiche Behandlung aller Proben, besonders bezüglich der Meßzeit und durch die Umrechnung der meist zu hohen Werte der optischen Dichte in die tatsächliche Trockenmasse.

4.6.2. Messung der Beleuchtungsstärke

Zur Messung der Beleuchtungsstärke der Bakterienkulturen wurde ein Lunasix-3-Belichtungsmesser von Gossen benutzt. Da jedoch eine Diffusorkalotte zur Lichtmessung verwendet werden mußte, die Beleuchtungsstärke aber definitionsgemäß nur mit einer ebenen Auffangfläche zu erfassen ist, waren die Meßwerte ungenau. Das in den Laborversuchen verwendete 40 W Glühlampenlicht erzielte durch die punktförmige Strahlungsquelle eine inhomogene Beleuchtung der Bakterienkulturen. Je nach ihrem Abstand zur Lampe schwankte die Beleuchtungsstärke zwischen 3.000 und 10.000 lx.

Die Beleuchtung der Freilandkulturen dagegen war durch die Sonnenstrahlung homogen und schwankte je nach Sonnenstand und Wetter zwischen 0,1 lx in der Nacht und maximal 60.000 lx bei wolkenlosem Mittagshimmel.

4.7. Bestimmung der Trockenmasse

Bakteriendichte Satorius-Membranfilter der Porengröße 0,45 μm wurden im Trockenschrank bei 376 K 3 Stunden lang getrocknet, im Exsikkator abgekühlt, gewogen, in ein Filtrationsgerät eingelegt und mit 10 ml Bakteriensuspension überschichtet. Mit der Wasserstrahlpumpe wurde die Flüssigkeit abgesaugt, während die Bakterien auf dem Membranfilter verblieben. Nach einer weiteren Trocknung (s.o.), wurde der Filter wieder gewogen und die Bakterientrockenmasse berechnet.

4.8. Isotachophorese

Meßprinzip

Bei der Isotachophorese handelt es sich um eine Elektro- phorese in einem diskontinuierlichen Elektrolyt-System, in dem zwei verschiedene Elektrolyte benutzt werden. Ein sogenannter Leitelektrolyt enthält ein schnell bewegliches Ion, z.B. Cl^- , der andere, als Folgeelektrolyt bezeichnete, eine langsame Ionenart. Der negativ geladene Leitelektrolyt steht im Kontakt mit der Anode, der Folgeelektrolyt mit der Kathode, bei positiv geladenen Elektrolyten umgekehrt. Die Elektrolyten werden in ihrer Beweglichkeit so ausgewählt, daß die zu trennenden Stoffe in ihrer Beweglichkeit zwischen Leit- und Folgeelektrolyt liegen. Wenn ein elektrisches Feld an das System gelegt wird, wandern die negativ geladenen Ionen zur Anode und zwar in der Reihenfolge ihrer Beweglichkeit, so daß es zur Trennung der Ionen des zu untersuchenden Stoffes kommt, entsprechend der Gleichung:

$$v = m \times E$$

wobei

- v Geschwindigkeit
- m Mobilität
- E Elektr. Feldstärke

sind. Wenn das wandernde System sein Gleichgewicht erreicht hat, bewegen sich die verschiedenen Ionen in eindeutig getrennten Zonen und unmittelbarem Kontakt miteinander, ohne einen background-Elektrolyten dazwischen, alle mit der Geschwindigkeit des Leitelektrolyten auf die Elektrode zu. Die Bezeichnung "Isotacho" bedeutet "gleiche Geschwindigkeit". Die Konzentration der einzelnen Ionen in jeder Zone kann durch das Gesetz von Kohlrausch beschrieben werden:

$$\frac{c_{L-}}{c_{A-}} = \frac{m_{L-}}{m_{L-} + m_{R+}} \times \frac{m_{A-} + m_{R+}}{m_{A-}}$$

wobei

- c_{L-} und c_{A-} Konzentration des Leitelektrolyten und Ions A der Probe,
- m_{L-} und m_{A-} Mobilität des Leitelektrolyten und des Ions A der Probe,
- m_{R+} Mobilität der Kationen

sind.

Wenn die Beweglichkeit aller beteiligten Ionen unter definierten Bedingungen konstant ist, kann die Kohlrausche Gleichung wie folgt vereinfacht werden:

$$c_{A-} = c_{L-} \times \text{konst.}$$

Sie besagt, daß die Ionenkonzentration A direkt proportional zu der des Leitelektrolyten ist. Im Gleichgewichtszustand ist also die Ionenkonzentration in jeder Zone konstant, und damit kann die Zahl der Ionen jeder Zone verändert werden durch die Veränderung der Länge der Zonen.

Eine Quantifizierung in der Isotachophorese ist somit auf eine einfache Längenmessung der Zonen reduziert, die durch Leitfähigkeits- und UV-Detektion registriert und auf einem Zweikanal-Potentiometer-Schreiber übertragen werden kann. Beide Signale zusammen, die Peakhöhe als Funktion des molaren Extinktionskoeffizienten im UV-Bereich und die Peakhöhe der Leitfähigkeitskurve machen eine Identifizierung der zu untersuchenden Substanz durch Zusatz von Vergleichsproben, die die Länge der entsprechenden Zone um die Menge des zugesetzten Stoffes vergrößert, möglich.

Die elektrophoretische Trennung organischer Säuren und ihre Identifizierung erfolgte in der Isotachophorese-Einrichtung "Tachophor" der Fa. LKB (Bromma, Schweden) bestehend aus einem Trennteil mit Spannungsgeber und einem Zweikanal-Potentiometer-Schreiber, die die Arbeitsgruppe Prof. Rubach des Instituts für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin für die Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Betriebsparameter:

Länge der Trennkapillaren: 39 und 43 cm,
Temperatur der Kapillaren: 278 und 279 K,
Betriebs- und Detektorstromstärke: 50, 70, 100 und 150 μ A,
Betriebsspannung: 2,5 - 25 kV,
Wellenlänge der UV-Absorption: 245 nm,
Schreibervorschub: 0,5 mm/s.

Zur Trennung von Säuren verwendete Leit- und Folgeelektrolyten:

1. L.: 10 mM HCL/β-Alanin 0,3 und 0,4 % HPMC, pH 3,0 ,
F.: 10 mM Capronsäure (6-Aminohexansäure)/Ba(OH)₂, pH 5,5 .
2. L.: 10 mM HCL/Capronsäure, 0,4 % HPMC, pH 4,5 ,
F.: 10 mM Morpholinoäthansulfonsäure (MES)/Tris, pH 6,0 .
3. L.: 7 mM HCL/Glycerin, 0,4 HPMC, pH 2,9 ,
F.: 5 mM Capronsäure, pK 4,88 .

Probenaufarbeitung:

Die zu untersuchenden Proben wurden mit Aqua dest. 1 : 10 oder 1 : 100 verdünnt, 2 x mit einem bakteriendichten Satorius-Membranfilter 11406, Porengröße 0,45 oder Schleicher & Schüll Einmal-Filter 0,2 µm filtriert und 1 - 5 µl der Probe mit einer Hamiltonspritze in die Isotachophorese-Apparatur eingespritzt.

Vergleichssubstanzen zur Identifizierung der Probeninhaltsstoffe und zur Kalibrierung der gefundenen Mengen wurden in einer Konzentration von ca. 0,4 - 0,8 g/l eingesetzt.

4.9. Flow-Kalorimetrie

Meßprinzip:

Mit Hilfe des Flow-Kalorimeters LKB-Flow-Mikrokalorimeter, Typ 10700, wurden die Wärmeumsätze von Rhodospirillaceae gemessen.

Die zu untersuchende Bakteriensuspension wird mit konstanter Geschwindigkeit in die Durchflußkammer eines abgeschlossenen Reaktionsraumes im Innern eines thermostatischen Blocks gepumpt. Bevor das Medium die Reaktionszelle erreicht, strömt es durch Wärmeaustauschspiralen, die eine konstante Temperatur der Flüssigkeit gewährleisten und sie der des Kalorimeterblocks angleichen. Die bei einer Reaktion freigesetzte Wärme verursacht eine Temperaturdifferenz, die einen Wärmefluß zwischen Reaktionskammer und Wärmesenke erzeugt. Die zwischen Kammer und Senke geschalteten Peltierelemente setzen die auftretende Temperaturdifferenz in eine Thermospannung um, die verstärkt und von einem Schreiber aufgezeichnet wird.

Im Falle einer konstanten Wärmeproduktion erreicht das Signal nach kurzer Zeit einen konstanten Wert, dessen Höhe über der Grundlinie der Wärmeproduktion entspricht.

Bei einem Wachstumsvorgang dagegen durchschreitet die Kurve ein Maximum und fällt danach, mit dem Aufhören des Wachstums, auf die Grundlinie zurück. Die Fläche unter der Kurve entspricht der Wärmemenge, die während des Wachstums freigesetzt wurde /31/.

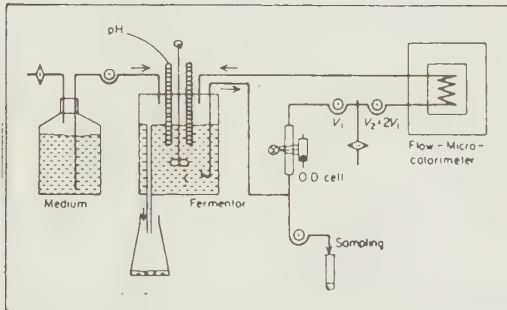


Abb. 8 : Vereinfachte schematische Darstellung einer Kombination von kontinuierlichem Chemostaten und Flow-Kalorimeter /48 verändert/.

Betriebsparameter des kombinierten Chemostat-Kalorimeter-Systems:

Kulturgefäße: 1000 ml Glasfermenter mit Wasserkühlung,
100 ml Erlenmeyerkolben.

Substrate: Synthetisches Lactat-Medium mit und ohne
Glutamat, Molke, Rüben- und Rohrzucker-
melasse.

Beleuchtung: 6 x 40 W Glühlampenlicht im Abstand von
ca. 10 cm und 3 x 40 W Glühlampenlicht.

Inkubationstempe-
ratur:

303 K.

Testkeim:

Rs. rubrum

Temperatur des thermostatischen Blocks:	298 K.
Volumen der Durchflußkammer	0,577 ml.
Schreibervorschub:	15 mm/h.
Schreiberempfindlichkeit:	100 mV.
Verstärkerspannung:	30 und 100 μ V.

Durchführung der Messung:

Die im Chemostaten befindliche Bakteriensuspension wurde nach der Probennahme für pH-, OD- und Lactatgehaltsbestimmungen zur Herstellung anaerober Bedingungen 10 Minuten mit Argon begast, die im Erlenmeyerkolben mit Paraffin überschichtet.

Das durch den Kalorimeter-Block gepumpte Medium wurde entweder in das Kulturgefäß zurückgeleitet oder verworfen.

Nach dem Versuchsende wurde wiederum die optische Dichte, der pH-Wert und der Lactatgehalt kontrolliert und der Flächeninhalt der vom Schreiber gezeichneten Kurve mit dem Polar-Planimeter vermessen.

4.10. Verbrennungskalorimetrie

Mit Hilfe der Verbrennungskalorimetrie wurde der Energiegehalt der Biomasse von Rs. rubrum, das durch Gefriertrocknung vorbehandelt war, und von Rp. capsulata, Rp. acidophila, Rm. vanniellii und Rs. tenue, denen im Trockenschrank bei 376 K Wasser entzogen worden war, bestimmt.

Bei dem verwendeten Kalorimeter, einem Eigenbau des Instituts für Biophysik der Freien Universität Berlin, handelt es sich um eine Weiterentwicklung eines von J. Phillipson /30/ vorgeschlagenen Gerätes, das Substanzmengen von 5 - 30 mg benötigt.

Meßprinzip:

In einer Verbrennungsbombe findet die explosionsartige Verbrennung der Probe mit einem Überschuß an reinem Sauerstoff statt. Die dabei entwickelte Wärme führt zu einer Temperaturerhöhung des Gefäßes, die mit einem Peltierelement als Thermosäule gemessen und deren zeitlicher Verlauf als Thermospannung aufgezeichnet werden kann. Die verlängerte Anfangs- und Endgerade der so erhaltenen Kurve und die dazwischens liegende Kurve selbst teilt man durch eine zwischen ihnen konstruierte Senkrechte in der Weise, daß zwei Flächen gleichen Inhalts entstehen. Erfahrungsgemäß liegt der Schnittpunkt der Senkrechten mit der Kurve bei 72,8 % der Gesamtkurvenhöhe. Die Länge dieser Senkrechten in Millivolt ist die Meßgröße, die multipliziert mit einem Kalibrierungsfaktor die Verbrennungswärme der Probe in Joule angibt /31/.

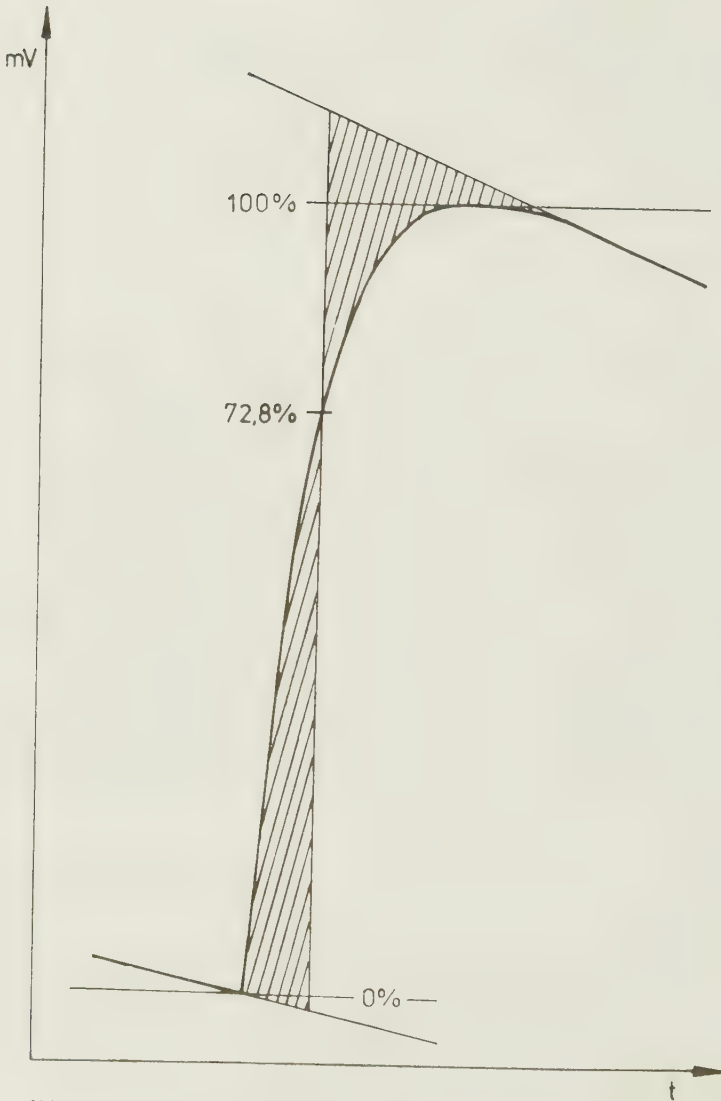


Abb. 9 : Zeitlicher Verlauf der Temperaturerhöhung im Kalorimeter durch Verbrennen einer Rs. rubrum-Probe.

4.11. Dünnschichtchromatographie, qualitative Zuckerbestimmung

Nach der Beschickung einer Kieselgelplatte G, 20 x 20 cm, mit den zu untersuchenden Lösungen und einer 1 %-igen Referenzlösung, die Fructose, Glucose, Saccharose und Maltose enthielt, wurde in einem Fließmittel aus Dichlormethan, Eisessig, Methanol, Wasser im Verhältnis 50 : 25 : 15 : 10 zweimal mit einer Zwischentrocknung bis zu einer Fließmittelhöhe von 15 cm entwickelt, nach einer weiteren Lufttrocknung mit einem Sprühreagenz bestehend aus Diphenylamin, Anilin, Phosphorsäure (85 %-ig) im Verhältnis 2 g : 2 ml : 10 ml besprüht, im Trockenschrank 10 Minuten bei 383 K erhitzt und die R_F -Werte bestimmt /49/.

4.12. Quantitative Zuckerbestimmung nach Luff-Schorl

Nach dem Enteiweißen von 2 ml der zu untersuchenden Proben mit jeweils 0,1 ml Carrez-Lösung I und II und Auffüllen der Proben auf ein Volumen von 10 ml wurden die Lösungen filtriert und je nach erwartetem Zuckergehalt 3 bis 8 ml davon in der Untersuchung eingesetzt.

25 ml Luffsche Lösung mit der Probe, die 10 bis 60 mg Zucker enthalten sollte, wurden auf 50 ml ergänzt und am Rückflußkühler genau 10 Minuten gekocht, danach schnell in kaltem Wasser abgekühlt und zur Bestimmung der Cu_2O -Menge titriert.

Der abgekühlten Flüssigkeit wurden ungefähr 1 g KJ, 25 ml 25 %-ige Schwefelsäure und lösliche Stärke als Indikator zugesetzt und mit 0,1 N Natriumthiosulfatlösung bis zum reinen Rahmgelb titriert.

Die Differenz aus Blindwert, dem Versuchsgang ohne die zu untersuchende Probe und Hauptversuch ergibt den gesuchten Zuckergehalt in mg /49/.

4.13. Enzymatische Lactatbestimmung

Folgende Substanzen von Boehringer Mannheim wurden für den Test verwendet:

NAD, freie Säure, Grad II,
L-LDH aus Schweineherz,
D-LDH aus Lactobacillus leichmanii.

Herstellung der Lösungen:

1. Puffer: 11,4 g 0,5 M Glycin in 200 ml Wasser lösen,
25 ml 0,4 M Hydrazinhydrat zugeben und auf
300 ml mit Wasser auffüllen.
2. NAD-Lösung: 900 mg ca. 40 mM Nicotinamid-adenindinucleotid
mit 30 ml Wasser lösen.
3. L-LDH und
D-LDH: Die Suspensionen werden unverdünnt verwendet.

Vorbereitung der Probe:

Die zu untersuchenden Probelösungen wurden mit einem bakterien-dichten Satorius-Membranfilter 11406, Porengröße 0,45 oder S & S Einmal-Filter, 0,2 μm , FP 030/3, filtriert, protein-haltige Proben mit eiskalter 1 N Perchlorsäure im Verhältnis 1 + 1 enteweiß, zentrifugiert und der Überstand mit 2 N KOH neutralisiert. Nach 20 Minuten Absatzzeit im Eisbad wurde das ausgefallene KClO_4 abfiltriert und falls erforderlich auf einen Lactatgehalt unter 0,1 g L- oder D-Lactat mit Wasser verdünnt.

Messung und Berechnung:

Zur photometrischen Lactatgehaltsmessung wurden 2,5 ml Puffer, 0,2 ml NAD-Lösung und 0,2 ml der vorbereiteten Probe bzw. bei der Messung des Leerwerts Wasser, gemischt und die Extinktion E_1 bei 340 nm im Zeiss Spektralphotometer PM2D gemessen. Nach Zugabe von 20 μ l L- oder D-LDH wurde die Lösung im verschlossenen Reagenzglas 30 Minuten bei 303 K im Wasserbad inkubiert und danach die Extinktion E_2 gemessen.

Die Extinktionsdifferenz $\Delta E = E_2 - E_1$ des Leerwerts wird von der der Probe subtrahiert und mit dem Verdünnungsfaktor F und dem Faktor 0,211, in den die Wellenlänge, das Testvolumen und das Molekulargewicht des Lactats eingehen, multipliziert

$$c = \Delta E \cdot 0,211 \cdot F \quad /50/.$$

Das Ergebnis gibt den Lactatgehalt der Probe in g/l an. Der Lactatgehalt wurde auch isotachophoretisch bestimmt (s.S. 34 ff).

4.14. Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB)

Folgende Reagentien wurden für den Test verwendet:

- 0,25 n $K_2Cr_2O_7$ -Lösung: $K_2Cr_2O_7$ p.A. bei 376 K 2 Stunden trocknen, im Exsikkator abkühlen und 12,259 g abwiegen.
- 95 - 97 %-ige H_2SO_4 , die 10 g Ag_2SO_4 /l enthält.
- 1/40 m Ferroin-Indikator.

- 0,10 n $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ -Lösung: 39 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ pro Liter mit 20 ml konzentrierter H_2SO_4 . Die Lösung muß täglich nachgestellt werden.

Berechnung der Normalität N der $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ -Lösung:

$$N = \frac{\text{ml } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 0,25}{\text{ml } \text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2}$$

Durchführung der Messung:

20 ml der zu untersuchenden Probe wurden am Rückflußkühler mit 10 ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Lösung, 0,4 g HgSO_4 , 40 ml H_2SO_4 und einer Siedehilfe 10 Minuten gekocht, mit einer Siedestärke von etwa 1 Tropfen Kondensatrückfluß/2 s.

Nach der Unterbrechung des Kochvorganges, einer Kühlerspülung mit 50 ml reinsten, gegen Chromsäure beständigen Wassers und der vollständigen Abkühlung wurde die Lösung nach einem Zusatz von 2 Tropfen Ferroin-Indikator gegen ca. 0,1 n $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ -Lösung bis zum Farbumschlag nach rotbraun titriert.

Ein Blindwert wurde unter gleichen Bedingungen mit 20 ml reinstem Wasser anstelle der Probe bestimmt.

Berechnung des CSB-Werts:

$$\text{mg CSB/l} = \frac{(a - b) \cdot c \cdot 8000}{\text{ml Probe}}$$

Wobei

- a Verbrauch von $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ für den Blindwert [ml],
- b Verbrauch von $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ für die Probe [ml],
- c Normalität der $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ -Lösung

sind /51/.

Vor ihrem Einsatz im CSB-Test wurden die zu untersuchenden Proben auf 1 : 10 oder 1 : 100 verdünnt, falls nötig die Bakterien abzentrifugiert und die Suspensionen mit bakterien-dichten Membranfiltern filtriert.

5. Ergebnisse

5.1. Kalibrierung der optischen Dichte gegen die Trockenmasse

Der Zusammenhang zwischen optischer Dichte (x_i) bei der Wellenlänge von 660 nm und der Trockenmasse (y_i) in mg/ml der untersuchten Rhodospirillaceae wurde einer Regressionsanalyse unterzogen. Die ermittelten Geraden wurden in den folgenden Versuchen zur Bestimmung der Trockenmassen aus den gemessenen optischen Dichten verwendet.

x_c	y_c	x_a	y_a	x_v	y_v	x_t	y_t
0,106	0,05	0,510	0,58	0,047	0,09	0,091	0,07
0,555	0,49	1,440	0,99	0,495	0,58	0,525	0,80
1,005	0,77	1,515	1,05	0,915	0,84	0,945	1,62
1,650	1,40	2,880	1,80	1,440	1,59	1,545	2,52
2,550	1,90			2,040	2,16	2,205	2,88

x_r	y_r	x_r	y_r	x_r	y_r
0,095	0,06	0,780	0,49	1,425	0,94
0,204	0,14	0,870	0,48	1,530	1,04
0,304	0,24	1,005	0,58	1,530	1,02
0,420	0,21	1,095	0,69	1,845	1,18
0,528	0,21	1,170	0,75	1,815	1,25
0,675	0,43	1,260	0,93	1,980	1,47

Tab. 4 : Zusammenhang zwischen optischer Dichte (x_i) und Trockenmasse [mg/ml] (y_i).

- x_c, y_c - Rp. capsulata, 5 Wertepaare,
- x_a, y_a - Rp. acidophila, 4 Wertepaare,
- x_v, y_v - Rm. vanniellii, 5 Wertepaare,
- x_t, y_t - Rs. tenue, 5 Wertepaare,
- x_r, y_r - Rs. rubrum, 18 Wertepaare.

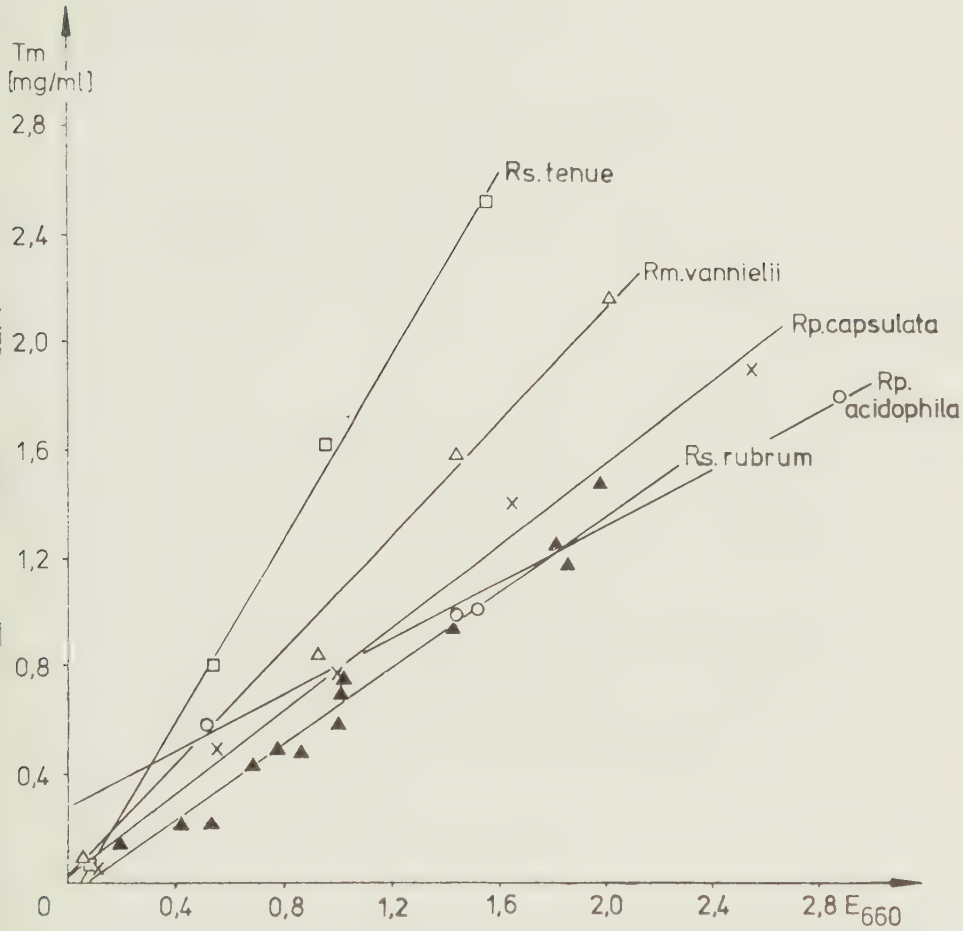


Abb. 10 : Kalibrierung der Trockenmasse gegen die optische Dichte.

x—x—	<i>Rp. capsulata</i> ,	▲—▲—	<i>Rs. rubrum</i> ,
○—○—	<i>Rp. acidophila</i> ,	□—□—	<i>Rs. tenue</i> .
△—△—	<i>Rm. vanniellii</i> ,		

Die Ermittlung der Steigungen m_i und der Achsenabschnitte c_i der Regressionsgeraden ergab für

$$\text{Rp. capsulata: } m_c = 0,76, \quad c_c = 0,03, \quad y_c = 0,76 x_c + 0,03$$

$$\text{Rp. acidophila: } m_a = 0,52, \quad c_a = 0,28, \quad y_a = 0,52 x_a + 0,28$$

$$\text{Rm. vannielii: } m_v = 1,05, \quad c_v = 0,02, \quad y_v = 1,05 x_v + 0,02$$

$$\text{Rs. rubrum: } m_r = 0,71, \quad c_r = -0,062, \quad y_r = 0,71 x_r - 0,062$$

$$\text{Rs. tenue: } m_t = 1,70, \quad c_t = -0,07, \quad y_t = 1,70 x_t - 0,07$$

Die Unterschiede in Steigung und Länge der Achsenabschnitte und damit zwischen optischer Dichte und Trockenmasse sind auf die differierenden Bakterienchlorophyll- und Carotinoidzusammensetzungen der Bakterien zurückzuführen.

Die größere Steigung der Regressionsgeraden y_v und y_t entstand aus der Tendenz der Purpurbakterien Rm. vannielii und Rs. tenue sich zu verklumpen, schnell auf den Boden der Gefäße abzusinken und so eine geringere optische Dichte als tatsächlich vorhanden vorzugeben.

5.2. Verbrennungswärme der Biomasse

Mit Hilfe der Verbrennungskalorimetrie wurde der Energiegehalt der Biomasse von Rp. capsulata, Rp. acidophila, Rm. vanniellii, Rs. rubrum und Rs. tenue gemessen.

<u>Rp. capsulata</u>	<u>Rp. acidophila</u>	<u>Rm. vanniellii</u>
23,51	25,02	24,08
20,60	24,70	25,40
23,46	25,18	25,80
23,72	22,10	24,36
24,87	25,33	24,36
19,94	22,49	22,80
24,47	25,50	26,38
23,80	23,39	

$\bar{x}_c = 23,05 \pm 1,79$	$\bar{x}_a = 24,21 \pm 1,35$	$\bar{x}_v = 24,74 \pm 1,21$
------------------------------	------------------------------	------------------------------

Tab. 5 : Energiegehalt der Bakterientrockenmasse in kJ/g.

<u>Rs. rubrum</u>	<u>Rs. tenue</u>
24,77	22,49
23,86	20,31
23,47	22,03
23,60	22,44
22,59	23,90
22,62	21,82
	22,99
	22,12
$\bar{x} = 23,49 \pm 0,82$	$\bar{x} = 22,26 \pm 1,03$

Tab. 6 : Energiegehalte der Bakterientrockenmassen in kJ/g.

Die erhaltenen Werte können sowohl mit den Verbrennungswärmen anderer Mikroorganismen verglichen als auch durch theoretische Berechnung überprüft werden, wenn die Elementarzusammensetzung der Rhodospirillaceae bekannt ist.

Während für Rhodospirillaceae Energiegehalte von 22,3 - 24,7 kJ/g gemessen wurden, werden für Hefen Werte zwischen 15,2 und 24,1 kJ angegeben /32, 33/.

Die theoretische Berechnung der Verbrennungswärmen von Mikroorganismen nach der Formel von Wang /34/ :

$$\Delta H_c = 33,78 C + 144,1 \left(H - \frac{1}{8} O \right) \text{ kJ/g}$$

in der C, H, O die Gewichtsfraktionen von Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff in der Trockenmasse sind, geht von einer vereinfachten Zusammensetzung der Mikroorganismen aus,

die mit der Formel



beschrieben werden kann.

Auf diese Weise wurden für Hefen Verbrennungswärmen von 21,8 bis 26,4 kJ/g errechnet /35/.

Da die von van Niel in Gewichtsprozent angegebene Elementarzusammensetzung der Rhodospirillaceae mit:

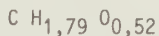
55 - 56 %	Kohlenstoff,
7 - 7,5 %	Wasserstoff,
15 %	Sauerstoff,
11 - 12 %	Stickstoff /36/

recht ungenau ist, wurde eine weitere Elementaranalyse des Purpurbakteriums Rs. rubrum von Herrn H. Steinbach, Institut für Technische Chemie der Technischen Universität Berlin durchgeführt.

Danach besteht Rs. rubrum aus:

48,71 ± 0,04 %	Kohlenstoff,
7,28 %	Wasserstoff,
33,82 ± 0,08 %	Sauerstoff,
10,19 ± 0,04 %	Stickstoff.

Die sich aus der Zusammensetzung der Elemente ergebende vereinfachte Formel für das Purpurbakterium



entspricht nach der Formel von Wang einer berechneten Ver-

brennungswärme von 23,2 kJ/g und stimmt damit recht gut mit dem in der Verbrennungskalorimetrie gemessenen Wert für Rs. rubrum von $23,5 \pm 0,8$ kJ/g überein.

Hefen mit einer identischen Elementzusammensetzung wie Rs. rubrum haben auch identische Energiegehalte:

Organismus	C	H _x	O _y	H _c [kJ/g]
<u>Rs. rubrum</u>	C	H _{1,79}	O _{0,52}	23,5
<u>S. cerevisiae</u> H 1022	C	H _{1,81}	O _{0,52}	23,4
Bäckerhefe	C	H _{1,82}	O _{0,51}	23,7

Tab. 7 : Vergleich der Energiegehalte ausgewählter Hefen /35/
mit dem von Rs. rubrum.

5.3. Aschegehalt von Rhodospirillaceae

Der Aschegehalt der untersuchten Rhodospirillaceae wurde aus der Bakterientrockenmasse durch einstündiges Veraschen des Zellmaterials bei 770 bis 870 K im Muffelofen bestimmt.

Rhodospirillaceae-Art	Aschegehalt [%]
<u>Rp. capsulata</u>	4,2
<u>Rp. acidophila</u>	3,5
	4,0
<u>Rm. vanniellii</u>	4,0
	4,4
<u>Rs. rubrum</u>	4,2
	3,9
<u>Rs. tenue</u>	4,2
$\bar{x} = 4,0 \pm 0,3$	

Tab. 8 : Aschegehalt der untersuchten Rhodospirillaceae-Arten, Mittelwert $\bar{x}$ und Standardabweichung s der Einzelergebnisse.

4 % Asche in Rhodospirillaceae ist ein relativ geringer Anteil im Vergleich zu 7 % in Hefen. Aber auch dort werden Aschegehalte von 1,9 bis 10 % beschrieben /35/.

5.4. Wasserstoff-Diffusion

Bei der bakteriellen Wasserstoff-Produktion wiesen die Ergebnisse der volumetrischen Wasserstoff-Messung auch nach der Korrektur auf Normalbedingungen (S. 24) noch Fehler auf, die durch die Diffusion des Gases in die Wasserwanne und von dort in die Luft verursacht wurden. Da mit der theoretischen Bestimmung der Diffusionsrate mit Hilfe des Fickschen Gesetzes bzw. durch Umformung der Laplaceschen Differentialgleichung der Wasserstoff-Verlust in die Luft und der von den Normalbedingungen abweichende Druck in den Gassammelgefäßen nicht erfaßt wird, mußte die Diffusionsrate experimentell bestimmt werden.

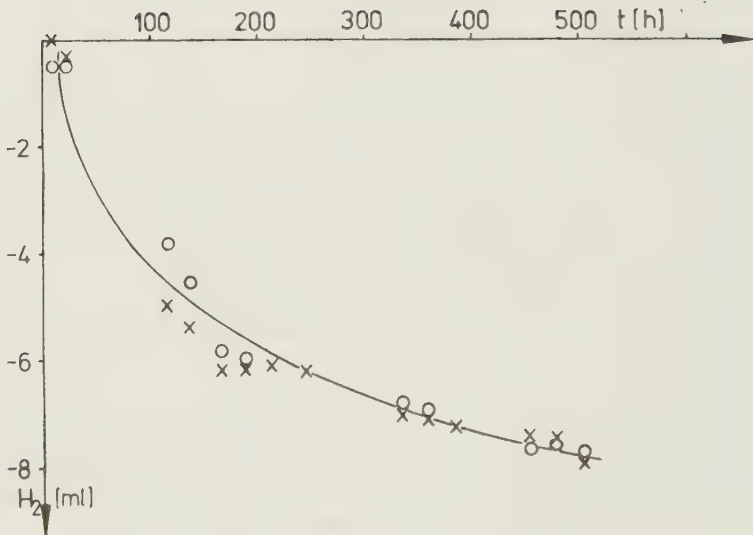


Abb. 11 : Verlust des Wasserstoffs in der Gassammelapparatur durch Diffusion aufgetragen über der Zeit.

- x - 50 ml Anfangsvolumen,
- o - 100 ml Anfangsvolumen.

Unabhängig vom Gasanfangsvolumen verringerte sich die Wasserstoff-Menge in der Sammelapparatur nach 100 Std. um 4 ml, nach 500 Std. um 8 ml Wasserstoff. Die Abnahmegeschwindigkeit sank mit der Zeit, was mit einer Wasserstoff-Sättigung des Wasserbades zu erklären ist. Die maximale Löslichkeit von 57 ml in der gegebenen Wassermenge, ohne Berücksichtigung der Diffusion in die Luft, berechnet aus dem Bunsenschen Löslichkeitskoeffizienten $\alpha = 0,0176 \text{ cm}^3 \text{ H}_2/\text{cm}^3 \text{ Wasser}$ bei 298 K, wurde mit vier Parallelansätzen nach 500 Std. aber erst zu ca. 50 % erreicht.

5.5. Wasserstoff-Produktion in synthetischen Medien

5.5.1. Einfluß der Vorkultur auf Wasserstoff-Produktion und Wachstum

Es sollte untersucht werden, ob das Nährstoffangebot in der Hauptkultur allein für eine maximale Wasserstoff-Produktion verantwortlich ist oder die Vorgeschichte der Rhodospirillaceae, die Art der Vorkultur zur Erzeugung der Biomasse, einen Einfluß auf den Ertrag hat.

	H ₂ [%]	Tm [mg/ml]	H ₂ Tm [%]
A _V	33	3,3	58
A _m	0	1,2	21
B _V	51	0,3	6
B _m	5	0	0
C _V	65	2,2	38
C _m	51	1,3	23
D _V	72	0,1	3
D _m	13	0	0
E _V	0	0,5	10
E _m	0	1,1	19

Tab. 9 : Wasserstoff-Produktion in Prozent des Substrat-Wasserstoffs und Biomasse-Erzeugung als Trockenmasse-Zuwachs in mg/ml und Prozent des Substrat-Wasserstoffs angegeben.
Erläuterungen im Text.

Die Untersuchung wurde exemplarisch an Rp. capsulata vorgenommen.

Die Bakterien der Medien A_V - E_V wurden im Vorkulturmedium 1 (s.S.18), das alle von den Rhodospirillaceae benötigten Substanzen enthält, herangezogen.

Die Bakterien der Medien A_m - E_m stammten aus einem Mangelmedium ohne Phosphat, so daß der typische Speicherstoff Polyphosphat nicht angereichert werden konnte.

	A	B	C	D	E
Lactat	x	x	x	x	-
Glutamat	x	-	x	-	x
Vitamine	x	x	x	x	x
Salze	x	x	x	x	x
Phosphatpuffer	-	-	x	x	x
Trispuffer	x	x	-	-	-

Tab. 10 : Zusammensetzung der Vorkulturmedien A - E.

x - Substanz ist im Medium vorhanden.

Mengenangabe s.S.18 .

- - Substanz fehlt im Medium.

Das Hauptkulturmedium A war mit dem Vorkulturmedium 1 bis auf den Ersatz des Phosphatpuffers durch Trispuffer identisch. Im Hauptkulturmedium B fehlte zusätzlich die Stickstoffquelle Glutamat. Das Medium C entsprach dem Vorkulturmedium 1, dem Medium D fehlte nur die Stickstoffquelle und die Nährlösung E besaß als einzigen Kohlenstoff-Donator Glutamat.

In allen Fällen war sowohl Wasserstoff- als auch die Biomasse-Produktion der in der Mangelmedien-Vorkultur vermehrten Rhodospirillaceae geringer als die aus einer Vollmedien-Vorkultur.

Blieb in der Hauptkultur der Phosphatmangel bestehen (A), so produzierten die Bakterien überhaupt keinen Wasserstoff; aber 1/5 des Substrat-Wasserstoffs wurden in der Biomasse festgelegt. Fehlte auch die Stickstoffquelle (B) und war damit das Wachstum ausgeschlossen, so wurden geringe Mengen Gas

gebildet. Auch bei den Bakterien aus der Vollmedien-Vorkultur war die Wasserstoff-Erzeugung in den Mangelmedien A und B reduziert. Aus dem Vollmedium C erzielten beide Bakteriengruppen hohe Gas-Erträge, die Bakterien der Mangel-Vorkultur mit 51 % des Substrat-Wasserstoffs ihr bestes Ergebnis, während sie im stickstofffreien Medium deutlich weniger produzierten und Rp. capsulata aus der Vollmedien-Vorkultur dafür seinen höchsten Ertrag erzielte. Die in den Medien B_V und D_V erzeugte Biomasse ist auf die Assimilation von gelöstem Luftstickstoff zurückzuführen. Das Medium E diente der Kontrolle der Wasserstoff-Produktion aus Glutamat. Es wurde jedoch erwartungsgemäß nur Biomasse erzeugt, von den Bakterien der Mangel-Vorkultur sogar mehr als von der anderen Gruppe.

5.5.2. Abhängigkeit des Wasserstoff-Ertrages vom Wasserstoff-Donator

Die Vollständigkeit des Abbaus verschiedener Wasserstoff-Donatoren in synthetischen Medien war exemplarisch mit Rp. capsulata als Testkeim für die Rhodospirillaceae zu untersuchen.

Nr.	C, H-Donator	Substrat-H ₂ [%]	Tm[mg/ml]	H ₂ [%]	t[h]
1	Acetat	41	0,72	10	48
2	Lactat	86	0,32	5,5	92
3	Malat	28	3,21	24	168
4	Fructose	-	2,75	51	168
5	Glucose	87	0,1	0,8	330
6	Saccharose	-	2,7	48	168

Tab. 11 : Verwertung von Kohlenstoff- und Wasserstoff-Donatoren durch Rp. capsulata.

Substrat-H₂[%]- Anteil des freigesetzten, gasförmigen Wasserstoffs in Prozent des vollständigen stöchiometrischen Abbaus des Substrats zu H₂ + CO₂ .

Tm mg/ml, H₂[%]-Absolute Zunahme der Bakterientrockenmasse in mg pro ml Suspension und Festlegung des Substrat-Wasserstoffs als Biomasse in Prozent.

t [h] - Versuchsdauer in Stunden.

Von allen untersuchten Substraten setzte Rp. capsulata aus dem Lactat- und dem Glucose-Nährmedium den größten Anteil, 86 und 87 %, des Substrat-Wasserstoffs als gasförmigen Wasserstoff frei, so daß nur noch wenig Biomasse entstand. 5,5 bzw. 0,8 % des Substrat-Wasserstoffs wurden in der Biomasse festgelegt. Doch benötigte Rp. capsulata im Glucose-Medium für dieselbe Gasmenge die 3,5-fache Zeit, da die Glucose zu Säuren abgebaut und damit der optimale pH-Wert des Bakteriums sehr schnell unterschritten und die Stoffwechselleistung stark reduziert wird.

Aus den Substanzen Fructose und Saccharose wurden ca. 50 % des Substrat-Wasserstoffs als Biomasse festgelegt, aber kein gasförmiger Wasserstoff erzeugt, da der pH-Wert von 7,0 wegen der Säurebildung auch hier nicht aufrechterhalten werden konnte.

Im Batch-Betrieb ohne ständige pH-Kontrolle erwies sich somit Lactat als bester Kohlenstoff- und Wasserstoff-Donator für die Wasserstoff-Produktion. Er hat gegenüber der Glucose den Vorteil, von allen untersuchten Rhodospirillaceae verwertet zu werden, s.a.S.13f. Ob allerdings die in der Literatur /20, 37, 38/ angegebenen Lactatkonzentrationen den höchstmöglichen Wasserstoff-Ertrag in möglichst kurzer Zeit erbringen, mußte überprüft werden.

5.5.3. Abhängigkeit des Wasserstoff-Ertrages von der Lactatkonzentration

Durch Variation des Lactatgehaltes zwischen 10 und 170 mM im synthetischen Nährmedium wurde die optimale Substratkonzentration für Rp.capsulata ermittelt.

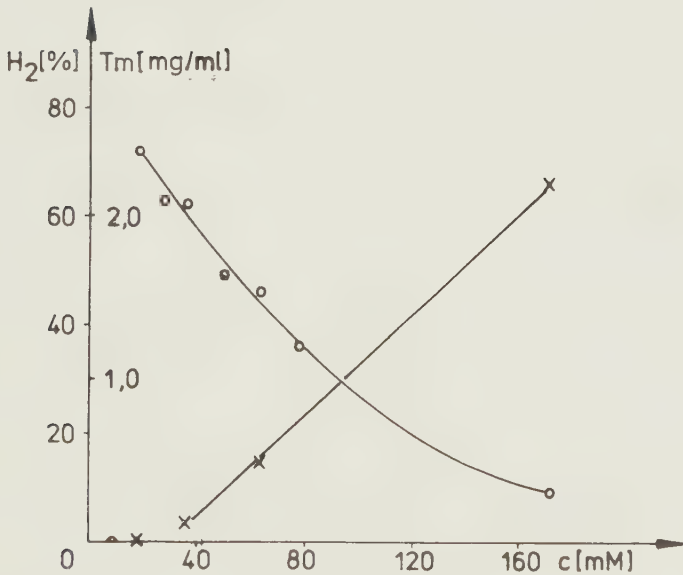


Abb. 12 : Wasserstoff-Ertrag in Prozent des maximal möglichen Wasserstoffs und Bakterientrockenmasse in mg/ml in Abhängigkeit von der Lactatkonzentration in mM.

- o - Wasserstoff-ertrag

- x - Bakterientrockenmasse

Der höchste Ertrag von 72 % des Substrat-Wasserstoffs wurde mit einer Lactatkonzentration von 18 mM im Medium, der niedrigste Ertrag von 9 % beim höchsten Lactatgehalt erzielt. Umgekehrt wurde ein besonders starker Biomasse-Zuwachs bei einem hohen Anteil der Kohlenstoff- und Wasserstoff-Quelle im Medium festgestellt.

Daß nur maximal 72 % des Substrat-Wasserstoffs freigesetzt wurden, lag an der zu hoch gewählten Bakteriendichte von 3,2 mg Trockenmasse pro ml in der Suspension, wie der nächste Versuch zeigt.

Bei weiteren Versuchen in synthetischen Medien wurde eine 18 mM Lactatkonzentration verwendet.

5.5.4. Abhängigkeit des Wasserstoff-Ertrages von der Bakterienkonzentration

Durch Variation der Bakterienmasse im 18 mM synthetischen Lactatnährmedium wurde der Einfluß der Zelldichte auf die Wasserstoff-Produktion untersucht.



Abb. 13 : Wasserstoff-Ertrag in Prozent des maximal möglichen Wasserstoffs in Abhängigkeit von der Bakterien-trockenmasse in mg/ml.

Die höchste Wasserstoff-Produktion von 86 % des Substrat-Wasserstoffs wurden bei einer Bakterienmasse von 2,6 mg/ml erzielt. Bei höheren oder niedrigeren Zelldichten nahm der Ertrag stetig ab, was mit Lichtmangel durch Selbstbeschattung im Inneren des Kulturgefäßes bzw. durch mangelnde Energie zur Substratumsetzung erklärt werden kann.

Im Falle des Lichtmangels werden neben dem beschriebenen anaeroben Citrat-Zyklus mit anschließender Wasserstoff-Freisetzung, die ihre Energie aus der Photosynthese bezieht, auch andere Gärwege beschriftet, so daß neben Wasserstoff weitere Endprodukte nachgewiesen werden können.

5.5.5. Temperatur- und pH-Optimum der Rhodospirillaceae

In Bergey's Manual /12/ werden folgende Temperatur- und pH-Optima für die untersuchten Rhodospirillaceae angegeben:

Organismus	T [K]	pH
<u>Rp. capsulata</u>	298 - 303	7,0
<u>Rp. acidophila</u>	298 - 303	5,8
<u>Rm. vannielii</u>	303	6,0
<u>Rs. rubrum</u>	303 - 308	6,8 - 7,0
<u>Rs. tenue</u>	303 ^x	6,6 - 7,4

Tab. 12 : Temperatur- und pH-Optima nach Bergey's Manual /12/.

^x Nicht als Optimum ausgewiesen.

Ob diese Angaben für optimale Lebensbedingungen auch mit einer maximalen Wasserstoff-Produktion verbunden sind, wurde exemplarisch an Rp. capsulata untersucht /14/:

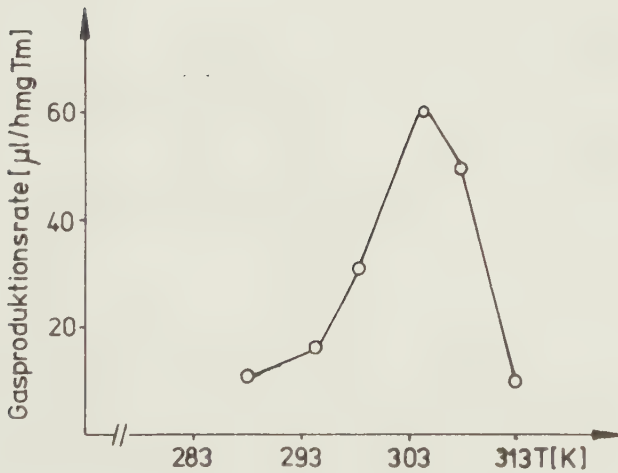


Abb. 14 : Produzierte Wasserstoffmenge pro Zeiteinheit über der Temperatur T aufgetragen /14 veränd./.

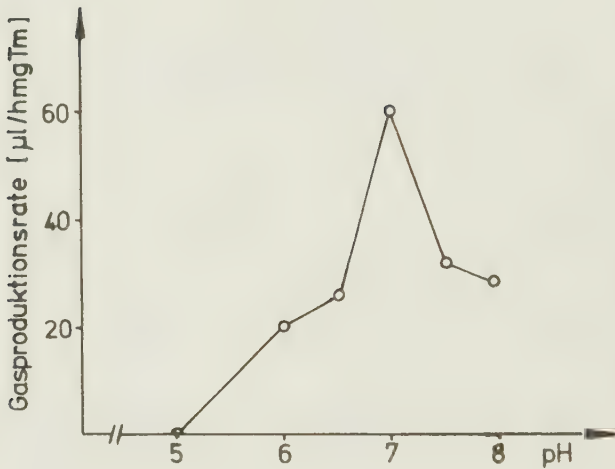


Abb. 15 : Produzierte Wasserstoffmenge pro Zeiteinheit über dem pH-Wert aufgetragen /14/.

Das pH-Optimum von 7,0 wurde völlig bestätigt, während das Temperaturoptimum auf $304,5 \pm 2$ K eingegrenzt werden konnte.

Alle Untersuchungen an Rhodospirillaceae wurden daraufhin bei 303 ± 1 K und mit pH 7,0 bzw. bei Rp. acidophila und Rm. vanielii mit pH 5,9 durchgeführt.

Die Untersuchungen zum Temperatur- und pH-Optimum von Rp. capsulata wurden aus der Diplomarbeit: "Wasserstoff-Produktion durch das Pupurbakterium Rhodopseudomonas capsulata " von U. Reh /14/ übernommen.

5.5.6. Abbauprodukte

Bei Lichtmangel kann man neben Wasserstoff auch andere Gärprodukte der Rhodospirillaceae im synthetischen Lactat-Medium nachweisen.

Mit Hilfe der Isotachophorese (s.a. Methoden) wurden z.B. folgende Säuren in der Suspension gefunden:

0,25 g Ameisensäure/l,
0,19 g Bernsteinsäure/l,
0,11 g Essigsäure/l,
0,20 g Milchsäure/l,
0,11 g Propionsäure/l.

Die Mengenangaben beziehen sich auf einen speziellen Versuchsansatz aus dem Abschnitt "Abhängigkeit des Wasserstoff-Ertrages von der Lactatkonzentration" mit 40 mM Lactat und 62 % Substrat-Wasserstoff.

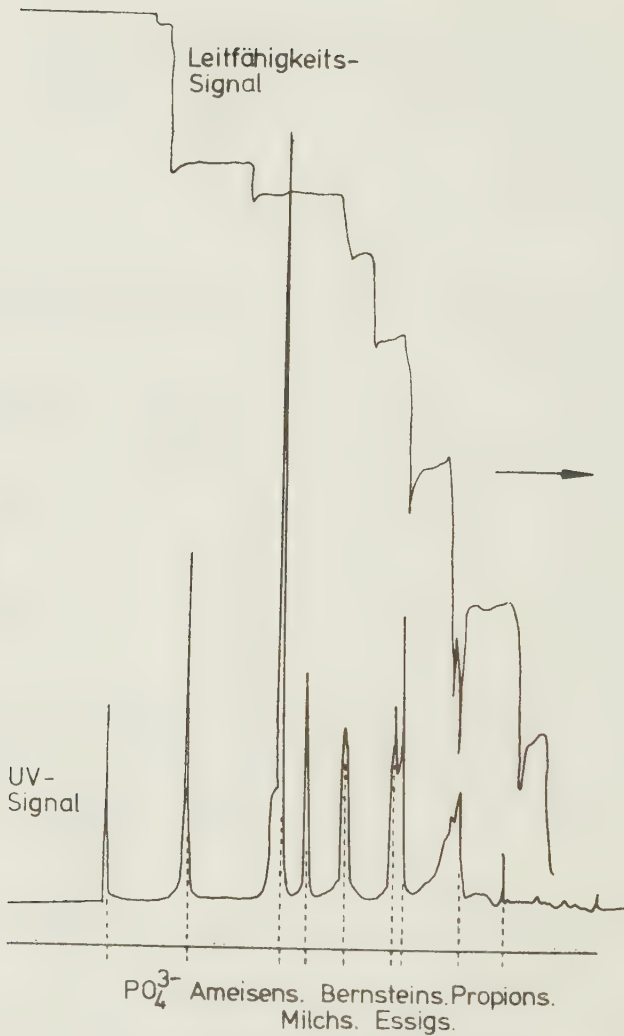


Abb. 16 : Isotachophoretische Trennung von Säuren in einem von Rp. capsulata behandelten synthetischen Lactat-Medium. 10 mM HCL/B-Alanin; 0,3 % HPMC, pH 3,0 als Leit- und 10 mM Capronsäure/Ba(OH)₂, pH 5,55 als Folgeelektrolyten (s.a. Methoden).

5.5.7. Wasserstoff-Produktion in semikontinuierlicher Kultur

Die Wasserstoff-Produktion in einer semikontinuierlichen Kultur über einen längeren Zeitraum sollte zeigen, ob eine gleichmäßige Gaserzeugung möglich ist oder ob der verwendete Testkeim *Rp. capsulata* nach einer bestimmten Fütterungsdauer in seiner Aktivität nachläßt.

Der Versuch erstreckte sich über 73 Tage und wurde nur aus Platzgründen abgebrochen. Bei jedem Nachlassen der Wasserstoff-Produktion wurden die Rhodospirillaceae, wie unter Material beschrieben, mit frischem Lactat-Medium versorgt, so daß sich ein Fütterungsintervall von ca. 7 Tagen ergab. Die durchschnittliche Ausnutzung des Wasserstoff-Donators lag bei nur 41 %, da die Bakteriendichte am Versuchsanfang mit 1 mg Tm/ml unter und mit 4,5 mg Tm/ml am Ende des Versuchs deutlich über der optimalen Bakterienkonzentration von 2,6 mg Tm/ml lag (s.S.65). Sie wurde offenbar so schnell überschritten, daß ein höherer Wasserstoff-Ertrag nicht registriert werden konnte. Der Grad der Substratausnutzung blieb im Gegenteil im Untersuchungszeitraum nahezu konstant, mit leicht steigender Tendenz, wie die Regressionsanalyse der erzielten Wasserstoff-Mengen in Prozent des Substrat-Wasserstoffs zeigt:

t [d]	H ₂ [%]	t [d]	H ₂ [%]
6,9	38,3	41,6	30,6
13,8	44,4	52,3	44,6
20,6	39,1	59,1	42,5
27,5	41,9	66,0	44,4
34,8	29,4	72,9	48,4

Tab. 13 : Zusammenhang zwischen Versuchsdauer t bzw. x
und Wasserstoff-Ertrag H₂ bzw. y.

Anzahl der Wertepaare: 10

$$y = mx + c$$

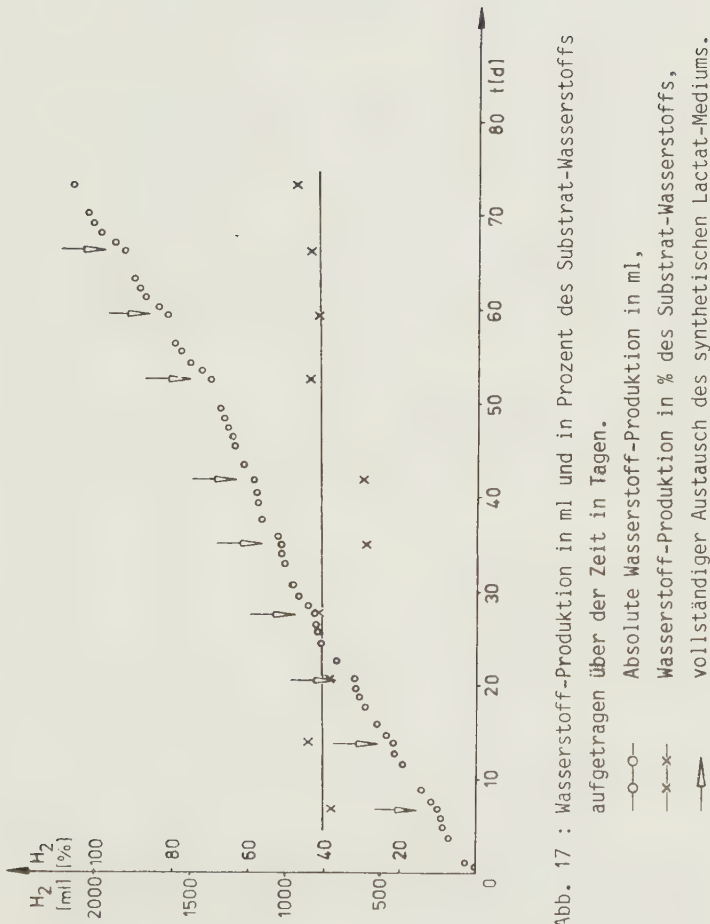
$$m = 0,04$$

$$c = 39,85$$

$$y = 0,04 x + 39,85$$

Die Ergebnisse (Abb. 17) zeigen, daß eine gleichmäßige Gas-
erzeugung über mindestens 2,5 Monate hinweg möglich und ein
Nachlassen der Aktivität der Bakterien in diesem Zeitraum
nicht zu verzeichnen ist.

Durch Verwerfen eines Teils der Bakterienmasse bzw. durch
eine Stickstoffbegrenzung müßte eine noch höhere Wasser-
stoff-Produktion, wie in den Vorversuchen dargestellt, zu
erreichen sein.



5.5.8. Reaktivierung der Wasserstoff-Produktion nach Sauerstoff-Begasung

Am Beispiel des Purpurbakteriums Rs. rubrum war die Reaktivierung der Wasserstoff-Produktion unter anaeroben Bedingungen nach einer aeroben Inkubationsphase mit manometrischen Methoden nach Warburg und Gilson zu untersuchen.

Während der Begasung der Rhodospirillaceae mit Sauerstoff-Argon-Gemischen verschiedener Zusammensetzung wurden 3,3 bis 4,2 μl Sauerstoff/h·ml·mg Tm assimiliert und 2,4 μl Kohlendioxid /h·ml·mg Tm freigesetzt. In einem von der Dauer der lag-Phase der Purpurbakterien abhängigen Zeitraum von 18 bis 36 Stunden nach der Austreibung des Gasgemisches mit reinem Argon wurden je nach der Vorbehandlung folgende Wasserstoff-Produktionsraten gemessen:

Vers.-Nr.	Zusammensetzung des Gasgemisches	H ₂ -Ertrag [μl /h·mg Tm]
1	0 % O ₂ , 100 % Ar	3,6
2	0 % O ₂ , 100 % Ar	4,0
3	21 % O ₂ , 78 % N ₂	3,7
4	33 % O ₂ , 66 % Ar	6,6
5	50 % O ₂ , 50 % Ar	2,6
6	100 % O ₂ , 0 % Ar	1,9
7	100 % O ₂ , 0 % Ar	2,2

Tab. 14 : Wasserstoff-Ertrag nach Sauerstoff-Begasung.

Die geringste Produktionsrate von nur 50 % gegenüber den unbehandelten Bakterien der Versuche 1 und 2 wurde nach einer Begasung mit 100 % Sauerstoff erzielt. Auch bei einer Vorbehandlung mit 50 % Sauerstoff und Argon war die Rate um 1/3 verringert. Nach einer Begasung mit Luft (Versuch 3) lag

der Wasserstoff-Ertrag in der gleichen Größenordnung wie bei den Versuchen 1 und 2. 33 % O_2 und 66 % Ar dagegen steigerte die Produktion um 170 % im Vergleich zu den unbehandelten Bakterien.

Das gleichzeitig mit dem Wasserstoff freiwerdende Kohlendioxid löste sich, wenn es nicht von KOH absorbiert wurde, in den ersten Stunden der Inkubationszeit vollständig in der Bakterien-suspension. Nach 24 Stunden jedoch wurden im Versuch 4 z.B. neben 6,6 μl Wasserstoff, auch 2,5 μl Kohlendioxid/h·mg Tm gemessen. Nach Sättigung der Lösung mit Kohlendioxid wären bis zu 3,3 μl CO_2 /h·mg Tm zu erwarten, da gemäß stöchiometrischem Abbau der Milchsäure ein Drittel des entstehenden Gases aus Kohlendioxid bestehen sollte.

Die Wasserstoff-Produktionsraten insgesamt lagen deutlich unter den volumetrisch gemessenen, bei denen bis zu 33,7 μl H_2 /h·mg Tm erreicht wurden.

Wegen der verlängerten Inkubationszeit wurde die Vollständigkeit des Substratabbaus zu Wasserstoff und Kohlendioxid bei diesen niedrigen Raten nicht überprüft.

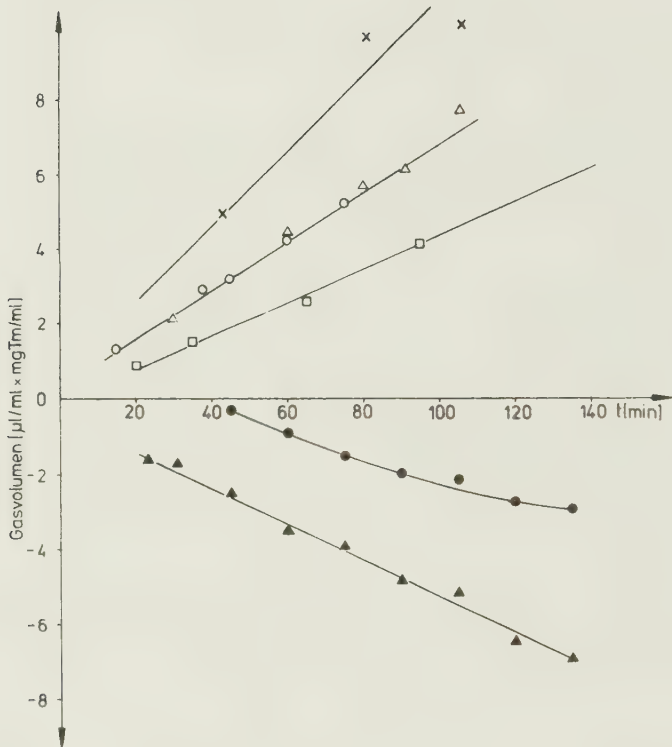


Abb. 18 : Sauerstoffverbrauch, Kohlendioxid- und H₂ -Produktion aufgetragen über der Inkubationszeit. Bei der Wasserstoff-Freisetzung wurde die Inkubationszeit um die lag-Phase verkürzt dargestellt.

- ▲—▲— Sauerstoffassimilation,
- Sauerstoffassimilation + Kohlendioxid-Produktion,
- △—△— Wasserstoff-Produktion nach Begasung mit 100 % Argon bzw. Luft,
- Wasserstoff- und Kohlendioxid-Produktion nach Begasung mit 100 % Argon,
- x—x— Wasserstoff-Produktion nach Begasung mit 33 % Sauerstoff und 66 % Argon,
- Wasserstoff-Produktion nach Begasung mit 50 % Sauerstoff und Argon bzw. 100 % Sauerstoff.

5.5.9. Wasserstoff-Produktion unter Freilandbedingungen

Mit Rp. capsulata wurden neben den Laborversuchen in synthetischem Lactatmedium auch Freilanduntersuchungen durchgeführt, die Anhaltspunkte über die Ertragsreduzierung und Verlangsamung der Wasserstoff-Produktion durch Witterungseinflüsse und Tag-Nacht-Wechsel geben sollten.

Wie erwartet wurde in der Nacht die Wasserstoff-Produktion aus Lichtmangel vollständig eingestellt, so daß sich ein treppenförmiger Kurvenverlauf für die Gaserzeugung ergab.



Abb. 19 : Wasserstoff-Produktion in Prozent des Substrat-Wasserstoffs aufgetragen über der Zeit.
Gestrichelte Linie: interpolierter Kurvenverlauf.

Als maximaler Wasserstoff-Ertrag wurden 42 - 46 % des Substrat-Wasserstoffs in einer Versuchsdauer von 165 bis 191 Stunden gemessen. 22 - 56 % des Substrat-Wasserstoffs wurden in der Biomasse festgelegt.

Setzt man die Ergebnisse der Laborversuche gleich 100 %, so produzierte Rp. capsulata im Freiland aus synthetischem Lactatmedium 59 % der Laborwerte in doppelter Zeit, nämlich in sieben statt in drei Tagen.

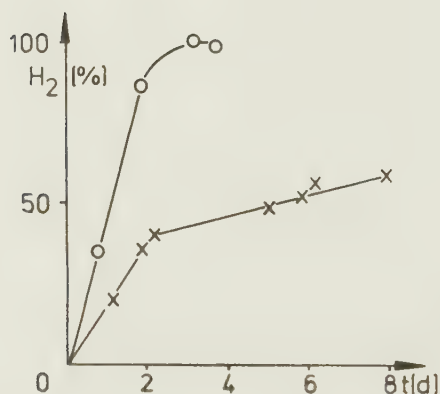


Abb. 20 : Vergleich der Wasserstoff-Produktion aus synthetischem Lactatmedium in Labor- (—o—) und Freilandkulturen (—x—) aufgetragen über der Versuchsdauer.

5.5.9.1. Einfluß von Dunkelphasen auf die Wasserstoff-Produktion

Um eindeutig nachweisen zu können, daß der treppenförmige Kurvenverlauf der Wasserstoff-Produktion im Freiland (s.S. 77) nur auf den Tag-Nacht-Wechsel und keine anderen Umwelteinflüsse zurückzuführen ist, wurde im Labor durch Abdunklung der Kulturgefäße eine entsprechende Situation wie im Freiland simuliert.

Versuchsbedingung	t [h]	H ₂ -Produktion [µl/h·mg Tm]
Licht	10,0 - 22,7	17,6 19,8
1. Dunkelphase	22,7 - 25,0	6,2 5,7
Licht	25,0 - 27,8	8,3 8,8
2. Dunkelphase	27,8 - 29,8	4,1 5,5
Licht	29,8 - 46,0	19,2 21,4

Tab. 15 : Wasserstoff-Produktionsraten im Licht und in ca. 2-stündigen Dunkelphasen in zwei Parallelversuchen.

Die erste ca. 2-stündige Abdunklung der Rp. capsulata-Suspensionen 22,7 Stunden nach Versuchsbeginn ließ die Wasserstoff-Produktionsrate auf 1/3 der im Licht gemessenen Werte absinken. In einer kurzen 165-minütigen Zwischenbelichtungszeit stiegen die Erträge zwar leicht an, aber die Ausgangswerte wurden nicht erreicht. In einer zweiten, auch ca.

2-stündigen Dunkelphase sank die Produktion weiter auf ca. 1/4 der ursprünglichen Rate ab. Während der anschließenden Dauerbeleuchtung wurden wieder die hohen Anfangserträge erzielt.

Wenn auch in diesem Versuch zwei Stunden Dunkelheit bzw. Licht nicht ausreichten, bei den Rhodospirillaceae eine vollständige Umstellung der phototrophen auf die hetere-trophe Lebensweise zu erreichen, so zeigte er doch, daß die Pausen in der Wasserstoff-Produktion im Freiland tatsächlich auf Lichtmangel zurückzuführen sind.

5.5.10. Wärmeproduktion von *Rs. rubrum* aus synthetischem Lactatmedium

Da jede Stoffwechselaktivität aufgrund der Wärmetönung der ablaufenden biochemischen Reaktion mit einer Wärmeproduktion verbunden ist, sollte zur Vervollständigung einer Energiebilanz mit Hilfe der Flow-Kalorimetrie die Energiemenge gemessen werden, die bei der Verwertung von Milchsäure durch Rhodospirillaceae frei wird.

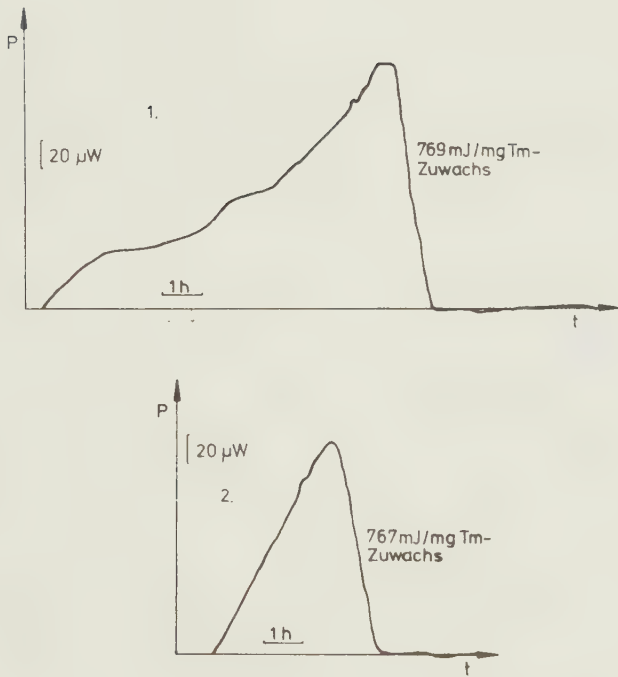


Abb. 21 : Wärmeproduktion einer aeroben (1.) und einer anaeroben (2.) *Rs. rubrum*-Kultur aufgetragen über der Zeit.

Vers.-Nr.	1	2	3
Substratverwertung	aerob	anaerob	endogener Stoffwechsel
Bakterienzuwachs [mg Tm/ml]	4,28	1,85	0
Wärmemenge [mJ/mg Tm-Zuwachs]	769,1	767,0	42,5
			[μ W/mg Tm/ml]
Lactatverbrauch [g/l]	0,217	0,094	-
Wärmemenge/Lactatverbrauch [kJ/Mol]	1365	1359	-
Max. Wärmeproduktion [μ W]	172	148	21,2

Tab. 16 : Stoffwechselaktivität von Rs. rubrum.
Erläuterungen im Text.

Da die Vermehrungsrate in der aeroben gegenüber der anaeroben Kultur mehr als doppelt so hoch war, wurde bei gleicher produzierter Wärmemenge, in der aeroben Kultur 2,3 mal so viel Lactat umgesetzt wie in der anaeroben.

Nach Abschluß des Bakterienwachstums waren 9 bzw. 3 % der anfänglichen Milchsäure abgebaut. Die Wasserstoff-Produktion hatte zu diesem Zeitpunkt, 7 bzw. 3 Stunden nach Versuchsbeginn, noch nicht begonnen.

Wurde den Rhodospirillaceae keinerlei abbaubares Substrat angeboten, bauten sie im endogenen Stoffwechsel Reservestoffe ab, verbunden mit einer Wärmeproduktion von 153 mJ/h·mg Tm/ml oder 42,5 μ W/mg Tm/ml.

5.6. Natürliche Medien

5.6.1. Molke

Da Molke kein steriles Substrat ist, wurde in einem Vorversuch mit Rp. capsulata der Einfluß des Autoklavierens auf den Wasserstoff-Ertrag im Gegensatz zur unsterilen Molke untersucht. Es wurde befürchtet, daß andere Bakterien die Rhodospirillaceae überwuchern und die Wasserstoff-Produktion unterdrücken würden.

Doch nicht die mangelnde Reinheit der Bakterienkultur, sondern die Zerstörung von Vitaminen während der Molke-Sterilisation beeinträchtigte das Ergebnis. 3 % des Substrat-Wasserstoffs wurden aus einer 20 %-igen unsterilen Molkelösung mit Phosphatpuffer gewonnen. Die Produktion in niedrigeren und höheren Molkekonzentrationen, sowie aus steriler Molke war noch geringer und lag im Durchschnitt bei 1 %.

Statt dessen wurden bis zu 35 % des Substrat-Wasserstoffs in der Biomasse festgelegt, 6 - 8 % in Ameisensäure, ca. 3 % in Milchsäure und in ähnlicher Größenordnung in einer nicht identifizierten Säure.

Auch die frischen H-Milch- und Frischmilch-Molken enthielten Säuren, wie die Isotachophoretischen Untersuchungen (s.a.S. 34, Methoden) zeigten:

5 - 10 % Zitronensäure und Milchsäure in sehr geringen Mengen unter 1 %, die auf die Stoffwechselaktivitäten von Bakterien hindeuten.

Die Menge des Hauptsubstrats der Molken, Lactose, wurde durch die quantitative Zuckerbestimmung nach Luff-Schorl /42/ ermittelt:

Die H-Milch-Molke enthielt 45,3 g Lactose/l und die Frischmilch-Molke 47,9 g/l.

Außer Milchsäure konnten keine anderen Säuren nach der Vorkultur mit Lactobacillen in der Molke isotachophoretisch festgestellt werden, während die qualitative und quantitative Zuckeranalyse mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und der Zuckerbestimmung nach Luff-Schorl (s.a. Methoden) bis zu 1 % Glucose in der Molke erbrachten.

5.6.1.1. Abhängigkeit des Wasserstoff-Ertrages von der Vorkultur und der Molkekonzentration

Ob sich der Wasserstoff-Ertrag aus den mit verschiedenen Milchsäurebakterien, L. bulgaricus und L. plantarum, vorkultivierten Molken unterscheidet und welchen Einfluß dabei die Molkekonzentration hat, war exemplarisch mit dem Rhodospirillaceae Rp. capsulata und Rs. rubrum zu untersuchen.

Rp. capsulata:

c %	5	7,5	10	15	20	30
H ₂ [%]- V ₁	5	3	0	1	1	2
H ₂ [%]- V ₂	7	7	6	4	3	2
H ₂ B [%]- V ₁	0	2	2	3	2	3
H ₂ B [%]- V ₂	0	0	4	7	3	3

Tab. 17 : Wasserstoff-Ertrag und Wasserstoff in der Biomasse in Prozent des Substrat-Wasserstoffs in Abhängigkeit von der Molkekonzentration und der Vorkultur.

H₂ [%]- V₁ Wasserstoff-Ertrag in Prozent vom Substrat-Wasserstoff nach der Vorkultur mit L. plantarum.

H₂ [%]- V₂ Wasserstoff-Ertrag in Prozent vom Substrat-Wasserstoff nach der Vorkultur mit L. bulgaricus.

H₂B [%]- V₁ Wasserstoff in der Biomasse in Prozent des Substrat-Wasserstoffs nach der Vorkultur mit L. plantarum.

H₂B [%]- V₂ Wasserstoff in der Biomasse in Prozent des Substrats-Wasserstoffs nach der Vorkultur mit L. bulgaricus.

Rs. rubrum :

c [%]	5	7,5	10	15	20	30
H ₂ [%]- V ₁	9	32	32	34	18	8
H ₂ [%]- V ₂	23	31	37	46	35	30
H ₂ B [%]- V ₁	20	14	9	8	7	6
H ₂ B [%]- V ₂	20	20	16	11	8	9

Tab. 18 : Wasserstoff-Ertrag und Wasserstoff in der Biomasse
in Prozent des Substrat-Wasserstoffs in Abhängig-
keit von der Molkekonzentration.
Abkürzungen s. Tab. 17.

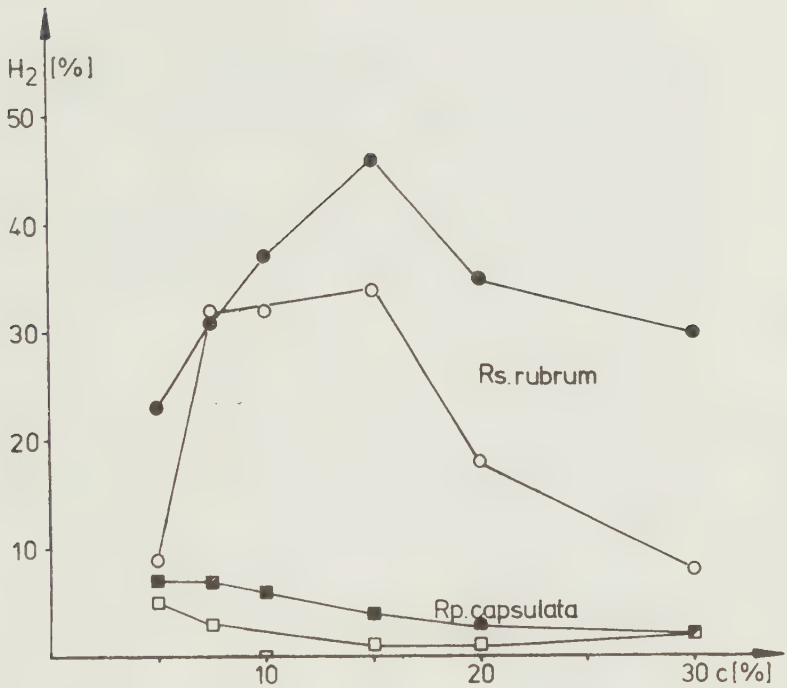


Abb. 22 : Wasserstoff-Produktion in Prozent des Substrat-Wasserstoffs durch *Rp. capsulata* und *Rs. rubrum* nach der Vorkultur mit *L. plantarum* und *L. bulgaricus*.

- *Rs. rubrum*, *L. plantarum* - Vorkultur,
- *Rs. rubrum*, *L. bulgaricus* - Vorkultur,
- *Rp. capsulata*, *L. plantarum* - Vorkultur,
- *Rp. capsulata*, *L. bulgaricus* - Vorkultur.

Rp. capsulata setzte maximal 7 % des Substrat-Wasserstoffs im 5 und 7,5 %-igen Molkemedium frei, das mit L. bulgaricus vorkultiviert worden war. Das Purpurbakterium verdoppelte damit den Gasertrag gegenüber dem aus einem Molkemedium ohne Vorkultur (S.83).

Die Biomasse-Produktion lag in der "L. plantarum-Molke" sehr niedrig, bei konstant 2 - 3 % des Substrat-Wasserstoffs. In der mit L. bulgaricus vorkultivierten 15 %-igen Molke wurde ein Maximum von 7 % erreicht.

Auch Rs. rubrum erzeugte aus der mit L. bulgaricus behandelten Molke deutlich mehr Wasserstoff als aus der unbehandelten oder mit L. plantarum vorkultivierten Molke. Der höchste Ertrag wurde mit 46 % des Substrat-Wasserstoffs in einer 15 %-igen "L. bulgaricus-Molke" erzielt.

Die Biomasse-Produktion zeigte bei Rs. rubrum in beiden Molken mit steigender Molkekonzentration eine fallende Tendenz. Die größte Menge von 20 % des Substrat-Wasserstoffs wurde in den 5 %-igen Molkemedien gemessen.

Für alle weiteren Versuche wurde nur noch L. bulgaricus zur Umwandlung der Lactose in Milchsäure eingesetzt und die Molke, wenn nicht anders vermerkt, in 15 %-iger Konzentration verwendet.

5.6.1.2. Wasserstoff-Produktion aus Molke

Da die Stämme Rp. capsulata und Rs. rubrum in Vorversuchen (s.S.84 ff) aus der Molke sehr unterschiedliche Wasserstoff-Mengen freisetzen, nämlich 7 und 46 % des Substrat-Wasserstoffs, sollten weitere Tests mit Vitamin- und Spurenelemente-Zusätzen zum Substrat sowie Untersuchungen mit anderen Rhodospirillaceae-Stämmen, die im Gegensatz zu Rp. capsulata und Rs. rubrum keinerlei Wachstumsfaktoren benötigen, zeigen, ob eine höhere Wasserstoff-Ausbeute möglich ist.

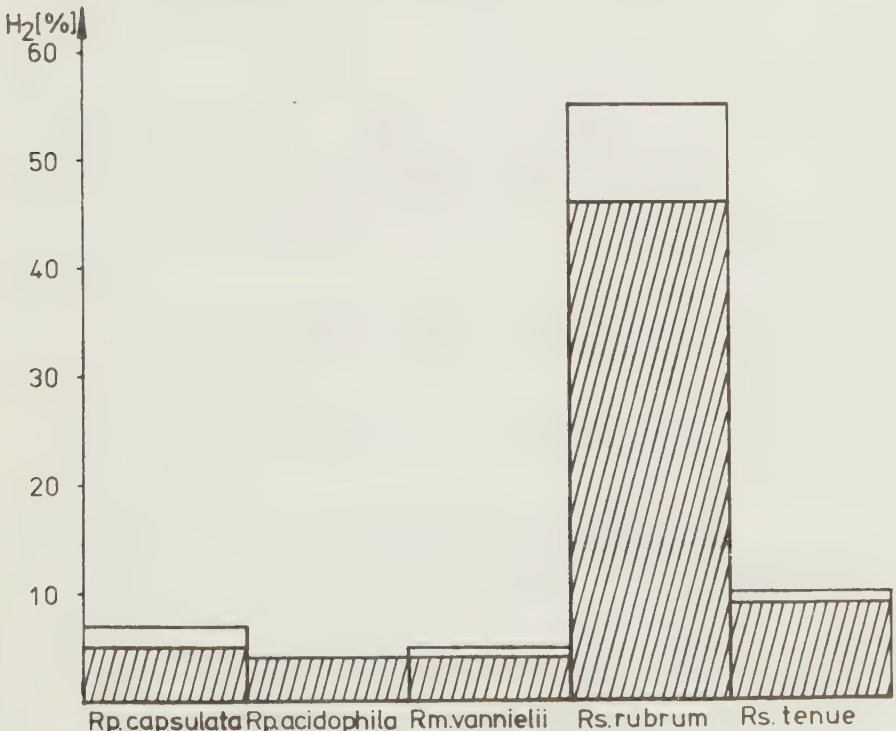


Abb. 23: Wasserstoff-Ertrag aus Molke in Prozent des Substrat-Wasserstoffs. Schraffierte Flächen: ohne, weiße Flächen: mit Vitamin- oder Spurenelemente-Zusatz.

Das Bakterium Rs. rubrum erzielte mit 46 % Gausausbeute vom Substrat-Wasserstoff ohne und 56 % mit einem Biotin-Zusatz zur Molke das höchste Ergebnis. Alle anderen untersuchten Arten erreichten nur 10 % Wasserstoff oder weniger:

<u>Rp. capsulata</u>	5 bzw. 7 %,
<u>Rp. acidophila</u>	4 %, ein Zusatz erhöhte hier den Ertrag nicht,
<u>Rm. vanniellii</u>	4 bzw. 5 % mit einem Spurenelementezusatz,
<u>Rs. tenue</u>	9 bzw. 10 % ebenfalls mit Spurenelementezusatz.

7 - 11 % des Substrat-Wasserstoffs wurden als Biomasse festgelegt. Nur Rp. acidophila vermehrte sich in Molke nicht.

Die Versuchsdauer bis zum Aufhören der Wasserstoff-Produktion betrug minimal 68 Stunden bei Rp. capsulata und maximal 431 Stunden bei Rp. acidophila.

5.6.1.3. Wasserstoff-Produktion unter Freilandbedingungen

Ebenso wie die Ertragsreduzierung der Wasserstoff-Produktion aus synthetischem Medium im Freiland sollte die bei Molke untersucht werden.

Als maximaler Wasserstoff-Ertrag wurden 35 % des Substrat-Wasserstoffs nach einer Versuchsdauer von 381 Stunden gemessen. 11 % des Substrat-Wasserstoffs wurden in der Biomasse festgelegt.

Setzt man die besten Ergebnisse der Laborversuche gleich 100 %, so produzierte der Testkeim Rs. rubrum im Freiland aus Molke 76 % der Laborwerte in 1,6 facher Zeit, nämlich in 16 statt in 10 Tagen.

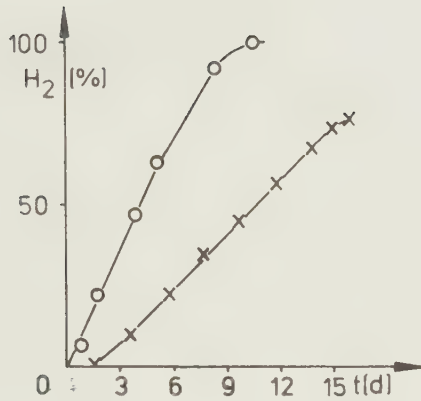


Abb. 24 : Vergleich der Wasserstoff-Produktion aus Molke in Labor- (-o-) und Freilandkultur (-x-) aufgetragen über der Zeit.

5.6.1.4. Wärmeproduktion von Rs. rubrum aus Molke

Wie bei der Verwertung des synthetischen Mediums (S. 81) wurde auch für Molke die Wärmeproduktion des Purpurbakteriums Rs. rubrum gemessen.

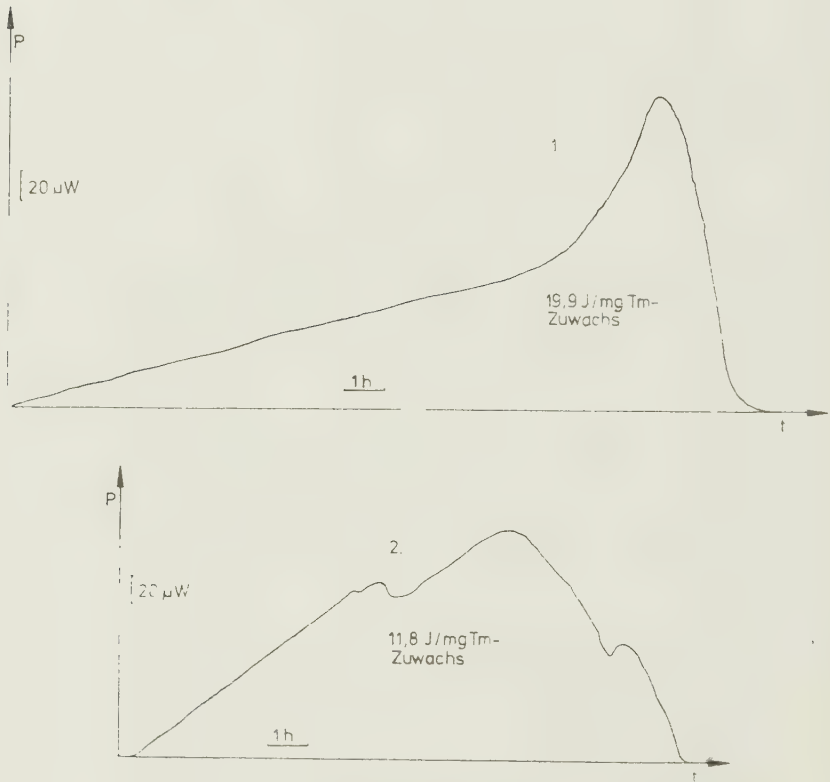


Abb. 25 : Wärmeproduktion in anaeroben Rs. rubrum-Kulturen aufgetragen über der Zeit.

Vers.-Nr.	1	2
Bakterienzuwachs [mg Tm/ml]	0,73	0,93
Wärmemenge [J/mg Tm-Zuwachs]	19,85	11,81
Dauer d. Wärmeprod. [h]	19	14
Lactatverbrauch [g/l] Wärmemenge/	0,95	0,72
Lactatverbrauch [kJ/Mol]	1373	1373
Max. Wärmeproduktion [μW]	215	159

Tab. 19 : Stoffwechselaktivität von Rs. rubrum unter anaeroben Bedingungen.
Erläuterungen im Text.

Im Substrat Molke stand einem geringen Bakterienwachstum eine hohe Wärmeproduktion gegenüber, so daß, verglichen mit der erzeugten Wärmemenge im synthetischen Medium, die 15 - 26 fache Energiemenge frei wurde.

Auch unterschieden sich die Parallelversuche 1 und 2 untereinander beträchtlich. Während im Versuch 1 nur eine Substanz in einem Zeitraum von 19 Stunden verwertet wurde, baute Rs. rubrum im Versuch 2 innerhalb von 14 Stunden drei verschiedene Wasserstoff-Donatoren ab, wie man aus den drei Maxima der Leistungs-Zeit-Kurve entnehmen kann.

Es handelte sich dabei wahrscheinlich beim ersten abgebauten Stoff um Glucose, beim zweiten, der Hauptfraktion, um Milchsäure und beim dritten um Ameisensäure (s.S.83 f.). Die Gesamtwärmemenge war hier nur fast halb so groß wie im Versuch 1.

Nach Abschluß des Bakterienwachstums waren 25 bzw. 26 % der anfänglichen Milchsäuremenge abgebaut. Die Wasserstoff-Produktion hatte bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht begonnen.

5.6.2. Buttermilch

Aus der wässrigen Phase der Buttermilch, die ähnlich wie Molke noch 4,55 g Lactose/l enthält, konnten mit Rp. capsulata maximal 13 % des Substrat-Wasserstoffs freigesetzt werden. Dieses Ergebnis wurde ohne Vorkultur bei einer Konzentration von 60 % erzielt. Die anderen Konzentrationen lieferten niedrigere Erträge.

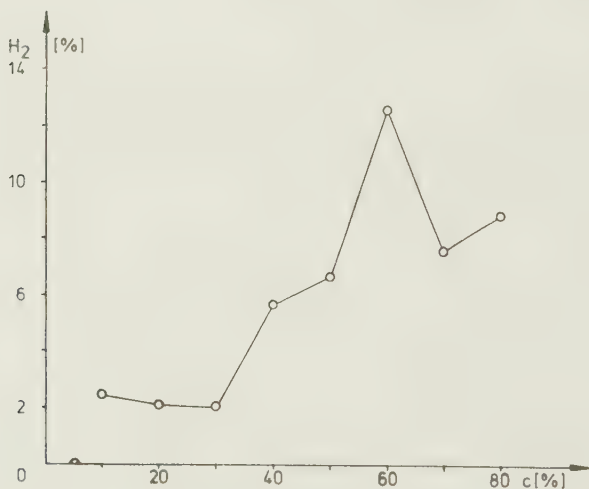


Abb. 26 : Wasserstoff-Ertrag in Prozent des Substrat-Wasserstoffs in Abhängigkeit von der Buttermilch-Konzentration aufgetragen.

Die Untersuchung der Wasserstoff-Produktion aus Buttermilch wurde nicht weiterverfolgt, da hier, stärker noch als bei den anderen getesteten Lebensmittelnebenprodukten, eine Konkurrenz der Verwertung als menschliches Lebensmittel oder Energiequelle zu befürchten war.

5.6.3. Rübenzuckermelasse

In Vorversuchen setzte Rs. rubrum aus der 50,5-fach verdünnten Melasse nur 8 - 9 % des Substrat-Wasserstoffs als Gas frei und legte 4 - 5 % als Biomasse fest. Das hatte vor allem zwei Gründe:

1. Die durch den Zuckerabbau entstehenden Säuren senkten den pH-Wert des Nährmediums sehr stark. Die Rhodospirillaceae reagierten auf diese unphysiologischen Bedingungen mit Schleimbildung und Verlangsamung ihres Stoffwechsels.
2. Rs. rubrum konnte zwar die bei der Saccharosespaltung entstehende Fructose, nicht aber die Glucose nutzen (s.a.S.14 und /12/).

Da im Batch-Betrieb die pH-Regulierung mit einigem Aufwand verbunden ist, wurde die Rübenzuckermelasse wie schon die Molke einer Vorkultur mit Lactobacillus bulgaricus unterzogen, um die Zucker in Milchsäure umzuwandeln und die Neutralisation des Mediums der eigentlichen Hauptkultur voranstellen zu können.

Nach ca. 50-facher Verdünnung und der oben beschriebener Vorkultur (s.a.S. 29) enthielt die gebrauchsfertige Melasse, wie durch isotachophoretische Trennung der Säuren festgestellt wurde,

1 % Milchsäure	und
0,6 % Essigsäure.	

Zucker konnten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nicht mehr registriert werden.

Essigsäure ist ein Produkt, das durch homofermentative Milchsäuregärung nicht entstehen dürfte, sondern auf eine Fremdinfection zurückzuführen ist. Diese Fremdinfectionen sind in keinem natürlichen Medium zu vermeiden, da es sich dabei um unsterile Substrate handelt.

Obwohl Rhodospirillaceae Essigsäure ebenfalls als Wasserstoff-Quelle verwerten, sind die Verluste durch den Abbau relativ hoch. Sie bestehen aus der Energiedifferenz von Milchsäure zu Essigsäure (ca. 150 kJ/Mol) und einem Mol Wasserstoff pro Mol Essigsäure, was 16 % des ursprünglichen Substrat-Wasserstoffs entspricht und von den Fremdbakterien zur eigenen Biomasse-Produktion genutzt wird.

Es bleibt einer Kosten-Nutzen-Rechnung vorbehalten, abzuwägen zwischen Energieerhaltung durch Hitzesterilisation der Melasse und Ersetzung der durch die Behandlung zerstörten wertvollen Inhaltsstoffe, z.B. der Vitamine (s.a. Diskussion).

5.6.3.1. Wasserstoff-Produktion aus Rübenzuckermelasse

Bei dem Substrat Rübenzuckermelasse, das in einer Konzentration von 1 : 80 eingesetzt wurde, ergab sich ein ähnliches Bild bezüglich der Wasserstoff-Produktion wie bei Molke:

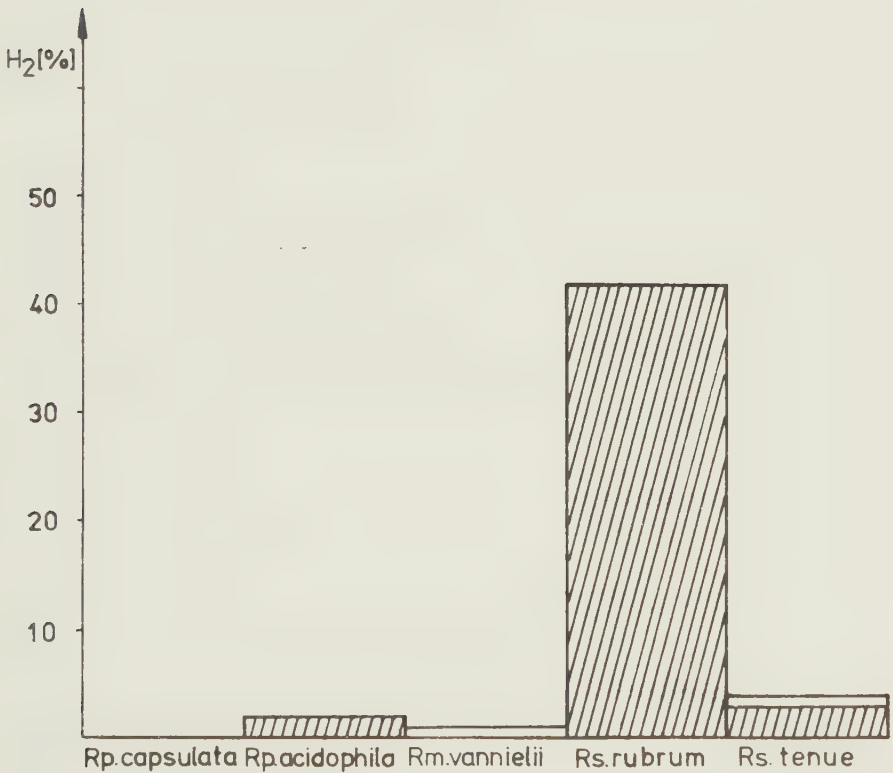


Abb. 27 : Wasserstoff-Ertrag aus Rübenzuckermelasse in Prozent des Substrat-Wasserstoffs.

Schraffierte Flächen: ohne,
weiße Flächen: mit Vitamin- oder Spurenelemente-
Zusatz.

Rp. capsulata produzierte keinen Wasserstoff aus Rübenzucker-
melasse, ebenso keine Biomasse. Rp. acidophila setzte 2 %
des Substrat-Wasserstoffs frei, wobei Vitamin- oder Spuren-
elemente-Zusätze den Ertrag nicht erhöhten. Rm. vanniellii
erzeugte ohne Zusätze kein Gas und nach Zugabe einer Spuren-
elementelösung 1 % des Substrat-Wasserstoffs. Rs. rubrum
erreichte wie schon in der Molke das höchste Ergebnis.
Doch konnte hier der Ertrag von 42 % durch eine Biotin- Zu-
gabe nicht gesteigert werden. Rs. tenue produzierte 3 % ohne
und 4 % mit Zugabe von Vitaminen und Spurenelementen.

Nur Rm. vanniellii und Rs. rubrum legten Wasserstoff als Bio-
masse fest, 2 bzw. 9 %. Die anderen untersuchten Rhodospirilla-
ceae vermehrten sich nicht in Rübenzuckermelasse.

Die Versuchsdauer bis zum Aufhören der Wasserstoff-Produktion
betrug 236 Stunden bei Rs. rubrum, bis zu 297 Stunden bei
Rp. acidophila.

5.6.3.2. Wärmeproduktion von *Rs. rubrum* aus Rübenzuckermelasse

Die mit den Stoffwechselaktivitäten verbundene Wärmeproduktion von *Rs. rubrum* sollte mit Hilfe der Flow-Kalorimetrie ebenso wie in synthetischem Medium und Molke auch in Rübenzuckermelasse gemessen werden.

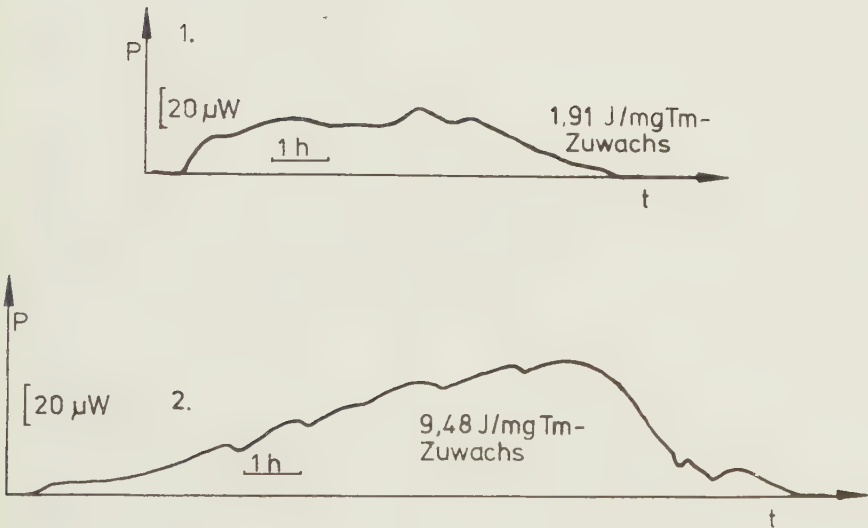


Abb. 28 : Wärmeproduktion in anaeroben *Rs. rubrum*-Kulturen aufgetragen über der Zeit.

Vers.-Nr.	1	2
Bakterienzuwachs [mg Tm/ml]	0,35	0,22
Wärmemenge [J/mg Tm-Zuwachs]	1,91	9,48
Dauer d. Wärmeprod. [h]	5,5	10
Lactatverbrauch [g/l]	0,044	0,138
Wärmemenge/Lactatver- brauch [kJ/Mol]	1367	1360
Max. Wärmeproduktion [µW]	33	66

Tab. 20 : Stoffwechselaktivität von Rs. rubrum unter an-aeroben Bedingungen.

Im Substrat Rübenzuckermelasse war das Bakterienwachstum noch geringer als in Molke. Die erzeugten Wärmemengen lagen zwischen den Ergebnissen mit synthetischem Medium und Molke, doch unterschieden sich die Parallelversuche 1 und 2 untereinander beträchtlich. Im Versuch 2 wurde die 5-fache Energiemenge des Versuchs 1 frei.

Nach Abschluß des Bakterienwachstums, nach 5,5 bzw. 10 Stunden, waren 1,7 bzw. 5,2 % der anfänglichen Lactatmenge abgebaut. Die Wasserstoff-Produktion hatte bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht begonnen.

5.6.4. Rohrzuckermelasse

In Vorversuchen verlief die Wasserstoff-Produktion schon in der nicht-vorkultivierten, ca. 55-fach verdünnten Melasse erfolgversprechend:

Rs. rubrum setzte 17 - 20 % des Substrat-Wasserstoffs als Gas frei und legte 3 - 4 % als Biomasse fest. Doch auch hier, wie bei den anderen natürlichen Substraten, war die Wasserstoff-Produktion von der starken Säurebildung im Medium beeinträchtigt.

Ebenso wie in der Rübenmelasse-Nährlösung reagierten die Rhodospirillaceae mit Schleimbildung. Deshalb wurde die Rübenzuckermelasse wie die anderen Substrate mit L. bulgaricus vorkultiviert (s.a.S.84 und S.95 f.).

Nach einer ca. 55-fachen Verdünnung und der oben beschriebenen Vorkultur enthielt die gebrauchsfertige Melasse, wie durch isotachophoretische Trennung der Säuren festgestellt wurde,

1,4 % Milchsäure und
0,5 % Essigsäure.

Zucker konnten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nicht mehr registriert werden.

Auch hier ist die Essigsäureproduktion auf eine Bakterieninfektion zurückzuführen. Es gelten die entsprechenden Ausführungen wie bei der Rübenzuckermelasse. Doch gehen statt 16 % nur 12 % des Substrat-Wasserstoffs der Brennstoff-Produktion verloren.

Wenn nicht anders vermerkt, wurde die Rohrzuckermelasse bei allen weiteren Untersuchungen in einer Konzentration von 1 : 86 mit destilliertem Wasser verwendet.

5.6.4.1. Wasserstoff-Produktion aus Rohrzuckermelasse

Da sich die Wasserstoff-Produktion der untersuchten Rhodospirillaceae in einigen Substraten durch einen Zusatz von Vitaminen oder Spurenelementen zum Medium steigern ließ, wurde auch bei der Rohrzuckermelasse der Ertrag mit und ohne Zusätze verglichen.

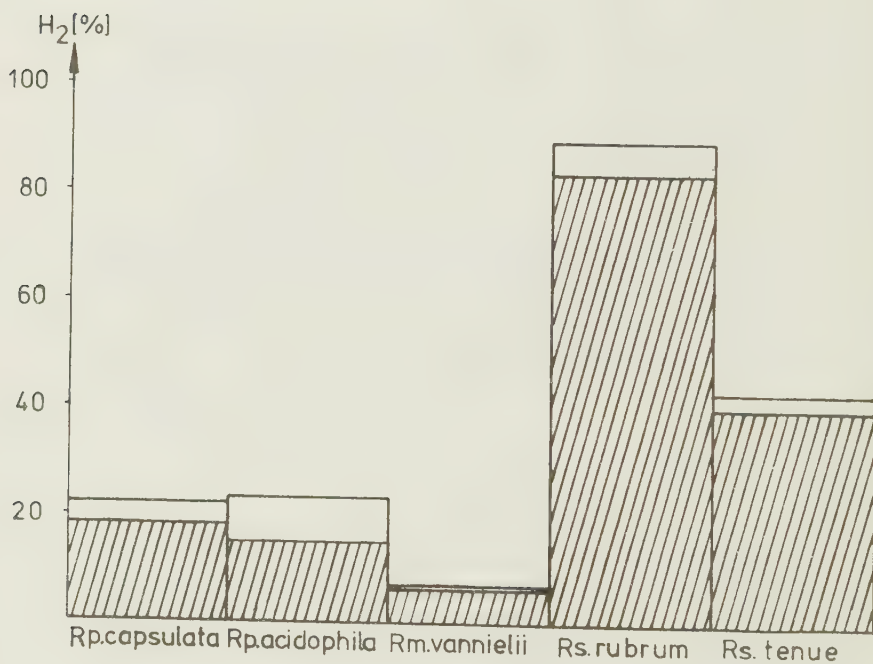


Abb. 29 : Wasserstoff-Ertrag aus Rohrzuckermelasse in Prozent des Substrat-Wasserstoffs.

Schraffierte Flächen: ohne,
weiße Flächen: mit Vitamin- oder Spurenelemente-
Zusatz.

Die Wasserstoff-Produktion aus Rohrzuckermelasse war für alle untersuchten Rhodospirillaceae höher als aus allen anderen getesteten Substraten.

Rp. capsulata erzeugte ohne Zusätze zum Medium 18 % und mit einer Spurenelementelösung in der Melasse 22 % des Substrat-Wasserstoffs.

Rp. acidophila setzte ohne Zusätze 15 % und mit Spurenelementen 23 % Wasserstoff frei. Rm. vanniellii erbrachte 6 % ohne und 7 % mit Spurenelemente-Zusatz.

Rs. rubrum war wieder der beste Substratverwerter. 83 % des Wasserstoffs wurden ohne Zusätze und 89 % mit Vitaminen erreicht. Rs. tenue setzte 40 % bzw. 43 % mit einer Vitamin- und Spurenelementmischung frei.

Im Substrat Rohrzuckermelasse vermehrten sich alle untersuchten Rhodospirillaceae. Rp. capsulata legte 13 - 14 % des Substrat-Wasserstoffs als Biomasse fest, Rp. acidophila 5 %, Rm vanniellii 6 - 8 %, Rs. rubrum 11 - 13 % und Rs. tenue 16 - 18 %, wobei jeweils mehr Bakterienmasse gebildet wurde, wenn keine Vitamin- oder Spurenelemente-Zusätze im Medium vorhanden waren.

Die Versuchsdauer bis zum Aufhören der Wasserstoff-Produktion betrug im Durchschnitt 10 Tage. Nur Rp. capsulata beendete seine Gaserzeugung schon nach 7 Tagen, während Rs. rubrum maximal 13,5 Tage aktiv war.

5.6.4.2. Wärmeproduktion von *Rs. rubrum* aus Rohrzuckermelasse

Die Wärmeproduktion des Purpurbakteriums *Rs. rubrum* als ein Ausdruck seiner Stoffwechselaktivität wurde in Rohrzuckermelasse mit Hilfe der Flow-Kalorimetrie gemessen.

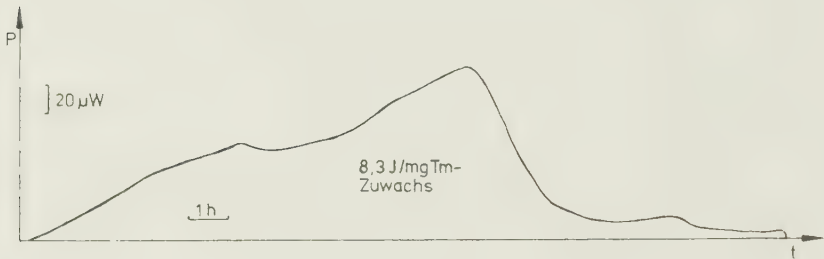


Abb. 30 : Wärmeproduktion einer *Rs. rubrum*-Kultur aufgetragen über der Zeit.

Bakterienzuwachs	0,96
[mg Tm/ml]	
Wärmemenge	8,32
[J/mg Tm-Zuwachs]	
Dauer d. Wärmeproduktion [h]	19
Lactatverbrauch [g/l]	0,53
Wärmemenge/Lactatverbrauch	1356
[kJ/Mol]	
Max. Wärmeproduktion [μW]	119

Tab. 21 : Stoffwechselaktivität einer anaeroben *Rs. rubrum*-Kultur in Rohrzuckermelasse.

Die Leistungs-Zeit-Kurve zeigte ähnlich wie bei der Verwertung von Molke den Abbau dreier verschiedener Substanzen.

Als erste Fraktion wurden wahrscheinlich Fructosereste in der vorkultivierten Melasse, als zweite die Milchsäure und als dritte die während der Vorkultur ebenfalls entstandene Essigsäure katabolisiert.

Die freigewordene Energiemenge lag in gleicher Größenordnung wie bei der Rübenmelasse, Versuch 2. Doch der Bakterienzuwachs in der Rohrzuckermelasse war größer und erreichte den Umfang des Wachstums in der Molke.

Nach Abschluß des Bakterienwachstums waren 14 % der anfänglichen Milchsäuremenge abgebaut. Die Wasserstoff-Produktion hatte bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht begonnen.

5.6.5. Kartoffelfruchtwasser

In Vorversuchen war der Wasserstoff-Ertrag aus einem 40 % Kartoffelfruchtwassermedium in Phosphatpuffer nur gering. Der Testkeim Rp. capsulata setzte 3 % des Substrat-Wasserstoffs frei und legte 16 % in der Biomasse fest. Auch hier, wie bei den anderen natürlichen Medien, wurden Säuren produziert, die den Stoffwechsel der Rhodospirillaceae durch das Absinken des pH-Werts beeinträchtigten.

Deshalb wurde auch das Kartoffelfruchtwasser einer Vorkultur mit L. bulgaricus, das die Zucker in Milchsäure umwandelt, unterzogen (s.a.S. 29f.). Um das Wachstum des anspruchsvollen Bakteriums in diesem Medium zu garantieren, wurden je 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ und folgende Vitamine dem Kartoffelwasser zugesetzt:

Biotin,
Folsäure,
Nicotinsäure,
Pantothensäure,
Riboflavin und
Thiaminsäure.

Die anfängliche Einstellung des pH-Werts auf 5,5 und die Inkubation bei einer Temperatur von 316 K unter strikt anaeroben Bedingungen im Anaerobentopf schränkt die Infektionsgefahr etwas ein.

Wenn der pH-Wert in der Vorkultur unter 5,5 absinkt, hat die Milchsäureproduktion begonnen und das Kartoffelwasser kann wie die anderen Vorkulturen weiterbehandelt werden.

Nach abgeschlossener Vorkultur wurden mit Hilfe der Iso-tachophorese folgende Säuren im Kartoffelwasser identifiziert:

2 % Milchsäure,
0,3 % Ameisensäure und
0,3 % Essigsäure.

Ameisensäure und Essigsäure sind auf eine Infektion der Vorkultur zurückzuführen, die der Brennstoff-Erzeugung durch Rhodospirillaceae 14 % des Substrat-Wasserstoffs zu eigenen Biomasse-Produktion entzogen hat.

5.6.5.1. Abhängigkeit des Wasserstoff-Ertrages von der Kartoffel- fruchtwasserkonzentration

Durch die Variation des Kartoffelwassergehalts im Medium sollte die optimale Substratkonzentration exemplarisch mit Rs. rubrum ermittelt werden.



Abb. 31 : Wasserstoff-Ertrag in Prozent des Substrat-Wasserstoffs in Abhängigkeit vom Kartoffelwassergehalt im Medium.

Während Rs. rubrum aus den 15, 20 und 30 %-igen Kartoffelwassermedium die gleiche Menge, nämlich 19 %, des Substrat-Wasserstoffs freisetzte, produzierte es bei höheren oder niedrigeren Substratgehalten weniger Wasserstoff.

Durch die Biomasse-Erzeugung wurden durchschnittlich 18 % des Substrat-Wasserstoffs festgelegt.

In allen weiteren Untersuchungen wurde das Kartoffelfruchtwasser, wenn nicht anders vermerkt, in 20 %-iger Konzentration als Nährmedium eingesetzt.

5.6.5.2. Wasserstoff-Produktion aus Kartoffelfruchtwasser

Von allen untersuchten Substraten wurde Kartoffelfruchtwasser von den Rhodospirillaceae am wenigsten verwertet.

Rp. capsulata setzte keinen Wasserstoff frei, Rp. acidophila 1 % des Substrat-Wasserstoffs, Rm. vanniellii 2 %, Rs. rubrum erreichte den höchsten Ertrag mit 19 % und Rs. tenue produzierte 1 % Gas.

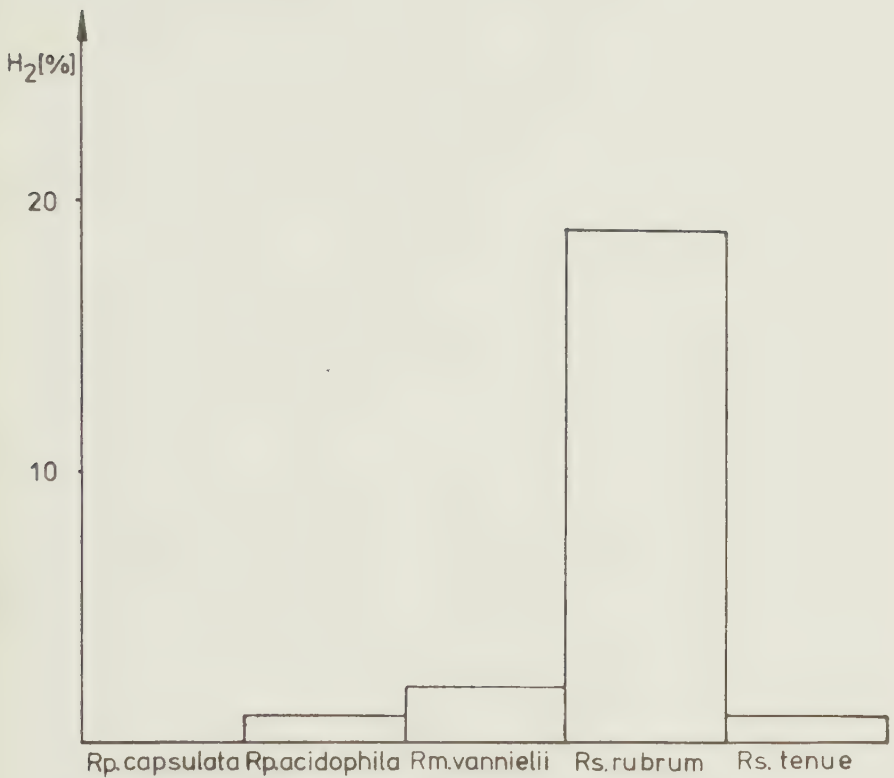


Abb. 32 : Wasserstoff-Ertrag aus Kartoffelfruchtwasser
in Prozent des Substrat-Wasserstoffs.

Der Vitamin- und Spurenelementebedarf der Rhodospirillaceae in Kartoffelfruchtwasser konnte wegen des erheblichen Vitaminbedarfs der Lactobacillen in der Vorkultur nicht gemessen werden.

Die Versuchsdauer bis zum Aufhören der Wasserstoff-Produktion betrug durchschnittlich 117 bis 118 Stunden, bei Rs. rubrum bis zu 236 Stunden.

5.6.5.3. Wasserstoff-Produktion unter Freilandbedingungen

Die Unterschiede der Wasserstoff-Produktion in Labor- und Freilandversuchen sollten am besten Kartoffelfruchtwasser-Verwerter Rs. rubrum untersucht werden.

Als maximaler Wasserstoff-Ertrag wurden 10 % des Substrat-Wasserstoffs nach einer Versuchsdauer von 216 Stunden gemessen. Bis zu 32 % des Substrat-Wasserstoffs wurden in der Biomasse festgelegt.

Setzt man die besten Ergebnisse der Laborversuche gleich 100 %, so produzierte der Testkeim Rs. rubrum im Freiland aus Kartoffelfruchtwasser 51 % der Laborwerte in gleicher Zeit von 9 bis 10 Tagen.

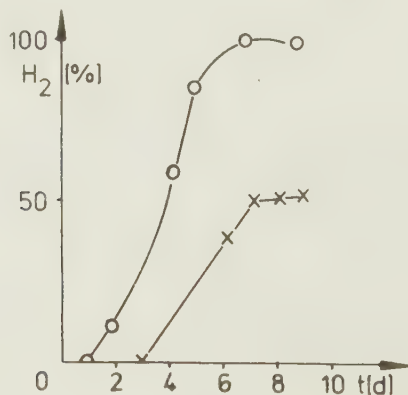


Abb. 33 : Vergleich der Wasserstoff-Produktion aus Kartoffelfruchtwasser in Labor- (-O-) und Freilandkultur (-X-) aufgetragen über der Zeit.

5.7. Chemischer Sauerstoffbedarf der natürlichen Medien

Da Rhodospirillaceae in Molke, Melasse und Kartoffelfruchtwasser organische Substanzen zu Wasserstoff und Kohlendioxid abbauen und die gebildete Biomasse leicht von der wäßrigen Lösung abgetrennt werden kann, müßte sich in mit diesen Stoffen verunreinigten Abwässern durch die Stoffwechselaktivität der Purpurbakterien ein Klärungseffekt nachweisen lassen.

Als Maß für die Wasserverschmutzung mit organischem Material wurde der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) von Molke, Rüben- und Rohrzuckermelasse und Kartoffelfruchtwasser bestimmt:

	UB[g/l]	NV[g/l]	NH[g/l]
Molke	67	35	16
Rübenzuckermelasse	731	546	270
Rohrzuckermelasse	702	679	273
Kartoffelfruchtwasser	43	39	43

Tab. 22 : Chemischer Sauerstoffbedarf der natürlichen Medien in g/l in den unbehandelten Medien (UB), nach der Vorkultur (NV) und nach der Hauptkultur (NH).

Durch die Behandlung des Kartoffelwassers mit Lactobacillus bulgaricus in der Vorkultur konnte ein geringer Reinigungseffekt erzielt werden, der aber in der Hauptkultur mit Rs. rubrum wahrscheinlich durch Bakterienreste wieder zunichte gemacht wurde. In der Rohrzuckermelasse war eine Klärung um 61 % nach der Hauptkultur gegenüber dem unbehandelten Substrat zu verzeichnen, in der Rübenmelasse um 63 % und bei der Molke um 76 %.

Diese Reinigung des Abwassers ist aber nur zu erreichen, wenn die aus dem organischen Material entstehende Biomasse vom Wasser abgetrennt und in irgendeiner Weise weiterverwendet wird.

6. Diskussion

Der steigenden Bedeutung der Mikroorganismen für den Menschen Rechnung tragend, bezeichnet die Kommission der Europäischen Gemeinschaften: " die Gesellschaft von morgen " als " Biogesellschaft " /52/. Diesem Trend folgend, liegt der Gedanke nahe, die mikrobiologische Energiefixierung, vor allem die Produktion von Wasserstoff als besonders zukunftssträchtigen Energieträger /3, 10/ zu untersuchen.

Die höchsten Energieerträge in Form von Wasserstoff erzielen Mikroorganismen dann, wenn die Sonne direkt Donator der zu fixierenden Energie, ohne Umweg über die Biomasse, ist. In fermentativen Dunkelprozessen dagegen kann theoretisch nur 1/6 der photosynthetisch gewonnen Energie als Wasserstoff festgelegt werden (s.S.4).

Doch der tages- und jahreszeitliche Gang der Sonneneinstrahlung in Nord- und Mitteleuropa verläuft im wesentlichen entgegengesetzt zum Energiebedarf; die Energiedichte ist in unseren Breiten mit maximal 900 W/m² /2/ nur gering; und die photosynthetische Ausnutzung des Energieangebots von 0,6 bis 3 % /3/ hat, verglichen mit technischen Energiewandlern, einen sehr niedrigen Wirkungsgrad zur Folge.

Da aber das Sonnenlicht kostenlos zur Verfügung steht, ist nicht der Wirkungsgrad der Energieumwandlung, sondern die Rückgewinnbarkeit der in den Mikroorganismen festgelegten Energie in möglichst kurzer Zeit der entscheidende Faktor.

Es bleibt einer Wirtschaftlichkeitsberechnung vorbehalten, mögliche besondere Syntheseleistungen der Organismen, wie die Erzeugung von Einzellerproteinen oder besonderen Stoff-

wechselprodukten, einer dem entgegenstehenden vollständigen Energierückgewinnung vorzuziehen.

Ob die Rhodospirillaceae, trotz der im photosynthetischen Prozeß nicht vorhandenen Wasserspaltung, zur technischen Wasserstoff-Produktion geeignet sind, sollte u.a. in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Der vielfach als Nachteil gewertete Bedarf der Rhodospirillaceae an organischen Kohlenstoff- und Wasserstoffdonatoren /4/, im Gegensatz zu den wasserstoff-produzierenden Cyanobakterien (s.S.6), kann sich zum Vorteil verkehren, wenn es gelingt, Wasserstoff in größeren Mengen aus Abwässern und Lebensmittelnebenprodukten freizusetzen und so die Abfallaufbereitung und Abwasserreinigung mit der Energiebereitstellung zu verbinden.

Die Wasserstoff-Produktion anderer Mikroorganismen, die mit den Rhodospirillaceae um den größtmöglichen Energieertrag konkurrieren und nur ausnahmsweise in der Literatur als Störfaktor bei der Stickstofffixierung beschrieben werden /53, 54/, sollen neben der Rückgewinnbarkeit des Wasserstoffs aus dem Substrat auch als Maßstab für die Erfolgsaussichten der Rhodospirillaceae bei der technischen Wasserstoff-Gewinnung dienen (s.a.S.6).

- Im anaeroben, fermentativen Dunkelprozeß produzierten z.B. immobilisierte Zellen von Clostridium butyricum bis zu $1,3 \mu\text{mol H}_2/\text{h} \cdot 100 \text{ mg}$ feuchter Zellmasse/g Gel /55/, was bei einem Wassergehalt der Zellen von 90 % etwa $2,6 \mu\text{l H}_2/\text{h} \cdot \text{mg Tm}$ entspricht. Eine Angabe über die Effektivität des Substratabbaus von Glucose zu Wasserstoff liegt hier nicht vor.

In einer Untersuchung der Wasserstoff-Produktion 12 verschiedener Enterobacteriaceae /56/ wurde als bestes Ergebnis die Freisetzung von maximal 7,1 % des Substrat-Wasserstoffs durch Klebsiella trevisanii LMG Kt 70 und 8,6 % durch K. oxytoca LMG Ko 92 aus Glucose gemessen. Aus Formiat dagegen wurden von fast allen Enterobacteriaceae 80 - 100 % des Substrat-Wasserstoffs freigesetzt. Das Wasserstoffbakterium Alcaligenes eutrophus produziert dagegen nur 4 $\mu\text{l H}_2/\text{h} \cdot \text{mg Tm}$ /57/.

- Cyanobakterien können, wenn der Sauerstoff durch besondere Maßnahmen vom Nitrogenase-Enzymsystem ferngehalten wird, durch Wasserspaltung Wasserstoff freisetzen. Kurzzeitversuche im Minutenbereich erbrachten mit Synechocystis aquatilis die 10-fache Gasmenge im Vergleich zu Rhodospirillum rubrum /58/. Doch der bei der Photolyse des Wassers ebenfalls produzierte Sauerstoff unterdrückte die Wasserstoff-Produktion schnell.

Durch Ausschalten des Photosystems II für 15 Stunden wurde mit Nostoc muscorum im diskontinuierlichen Betrieb bis zu 1 l Wasserstoff/l Kultursuspension und Tag /11/ oder 15 - 20 $\mu\text{mol H}_2/\text{ml}$ feuchter Zellmasse und Stunde /59, 60, 61/ produziert, was etwa 30 - 40 $\mu\text{l H}_2/\text{h} \cdot \text{mg Tm}$, bei einem Wassergehalt von 90 % entspricht /62/. Algen, die ebenso durch Wasserspaltung Wasserstoff freisetzen können, erreichten kurzzeitig 48 bis 70 $\mu\text{mol H}_2/\text{h} \cdot \text{mg Chlorophyll}$ /21/, was ca. 20 bis 50 $\mu\text{l H}_2/\text{h} \cdot \text{mg Tm}$ entspricht. Auch hier inhibierte der Sauerstoff die Wasserstoff-Produktion.

- Von zellfreien Systemen, bestehend aus Spinacia oleracea-Chloroplasten, Clostridium kluveri-Hydrogenase und Ferredoxin erhoffte man sich:

- eine Wasserstoff-Produktion, unabhängig von energie-verbrauchenden, metabolischen Prozessen der intakten Zellen,
- eine größere Flexibilität bei der Optimierung dieses in-vitro-Systems, da die verschiedenen Komponenten nicht aus einer einzelnen Zelle stammen mußten,
- und damit eine höhere Wasserstoff-Ausbeute als mit vollständigen Organismen.

Doch wie bei den Cyanobakterien und Algen kam auch hier die Wasserstoff-Produktion schnell durch den bei der Wasserspaltung freiwerdenden Sauerstoff zum Erliegen. Durch den Zusatz von Ascorbat und DPIP als Elektronendonator für das Photosystem I, DCMU als Photosystem II-Blocker bzw. Glucose/Glucoseoxidase, das bei der Umwandlung in Gluconat und H_2O_2 den entstehenden Sauerstoff bindet, konnten in den ersten Versuchen $1,5 \mu\text{mol } H_2 / 15 \text{ min} \cdot 0,4 \text{ mg Chlorophyll}$ erzeugt werden. Nach 15 Minuten Produktion sank die Rate ab und betrug nach 30 Minuten nur noch $1/4$ der ursprünglichen Aktivität. Trotz der Schutzmaßnahmen gegen Sauerstoff waren Ferredoxin-Autooxidation, Hydrogenase-Inaktivierung und Instabilität des Photosystems II zu beobachten /63/.

Später folgende Untersuchungen mit Spinacia oleracea-Chloroplasten, Clostridium pasteurianum-Hydrogenase und Spirula maxima-Ferredoxin erbrachten $60 - 70 \mu\text{mol } H_2 / \text{mg Chlorophyll}$ in 8 Stunden und $15 - 20 \mu\text{mol } H_2 / \text{mg Chlorophyll}$ in 2 Stunden. Die Begrenzung der Lebensdauer auf 8 Stunden war wiederum auf den photosynthetisch erzeugten Sauerstoff und die damit verbundene Ferredoxin-Oxidation zurückzuführen /64/.

Zusammenfassend läßt sich sagen:

Der Anspruch, Energie in Form von Wasserstoff aus Wasser zu gewinnen, wurde nicht eingelöst, da organische Substanzen wie Ascorbat/DPIP als Elektronenquelle dienten und das Photosystem II inaktiviert bzw. für jedes zu bindende Mol Sauerstoff ein Mol Glucose oxidiert und für jedes dabei auch entstehende Mol H_2O_2 ein Mol Äthanol zu Acetaldehyd abgebaut wurde.

Auch vom Standpunkt der aufzuwendenden Kosten und Energie räumt Weaver in einem zusammenfassenden Bericht /11/ der Wasserstoff-Produktion durch zellfreie Systeme kaum Chancen in der praktischen Anwendung ein.

- Ein wichtiger Faktor, der die Effektivität der Stickstoff-fixierung vieler landwirtschaftlich bedeutender Leguminosen mindert, stellt die Wasserstoff-Produktion von Rhizobium in den Wurzelknöllchen dar. Bis zu 60 % der Elektronen fließen unter ungünstigen Bedingungen über den Nitrogenase-Enzymkomplex zu den Protonen statt zum Stickstoff, so daß bis zu $296 \mu l H_2/h \cdot g$ Frischgewicht /53/ und $16,36 \mu mol H_2/h \cdot g$ Frischgewicht /54/ produziert werden, was bei 80 % Wasser in der Frischmasse etwa 1,5 bis $1,8 \mu l H_2/h \cdot mg$ Tm entspricht.

Diese Zahlen zeigen, daß einerseits eine beträchtliche Menge Wasserstoff als unerwünschtes Nebenprodukt ständig in der Landwirtschaft entsteht und andererseits verschiedene Versuche zur Maximierung der biologischen Wasserstoff-Erzeugung, trotz eines oft erheblichen Versuchsaufwandes, sich noch nicht über die in der Natur vorkommende Größenordnung erhoben haben.

- Die verschiedenen Rhodospirillaceae-Arten können unter optimalen Bedingungen in einem anaeroben, phototrophen Prozeß aus organischen Wasserstoff-Donatoren beträchtliche Mengen Wasserstoff freisetzen.

Die folgende Tabelle stellt am Beispiel einiger neuerer Arbeiten die untersuchten Organismen, die maximalen Produktionsraten und die verwendeten Wasserstoff-Donatoren zusammen:

Rhodospirillaceae- Art	H ₂ -Prod.- Rate	H ₂ -Donator	Autor
<u>Rm. vannielii</u>	9	Lactat	Knobloch /65/
<u>Rp. capsulata</u>	120 - 170	?	Colbeau /66/
	120	Pyruvat	Hillmer /67/
	113	Lactat	Hillmer /67/
	130	Lactat	Hillmer /37/
	58	Lactat	Knobloch /65/
	131	Lactat	Meyer /68/
	41	Malat	Song /69/
	96	Lactat	Tsygankow /70/
	34	Lactat	diese Arbeit
	168 - 176	?	Weaver /21/
<u>Rp. capsulata Z-1</u>	100 - 150	Lactat	Hillmer /71/
<u>Rp. palustris</u>	40 - 50	Lactat	Kim /72/
	40	Malat	Vincenzini /73/
	24	?	Zumpft /74/
<u>Rp. sphaeroides</u>	9	Glucose	Macler /75/
	36	Malat	Serebryakowa /76/
<u>Rp. sphaeroides B5</u>	138	Lactat	Kim /77/
	90	Malat	Watanabe /78/
<u>Rp. sphaeroides S</u>	90	Malat	Watanabe /78/
<u>Rhodopseudomonas sp.</u>	104	Malat	Matsunga /79/
<u>Rhodopseudomonas sp. TN3</u>	84	Malat	Watanabe /78/
<u>Rs. rubrum</u>	40 - 50	Lactat	Kim /72/
	64	Malat	Mijake /80/
	87	Malat	Sweet /81/
	146	?	Weaver /21/

Tab. 23 : Neuere Literaturangaben zur Wasserstoff-Produktion
verschiedener Rhodospirillaceae-Arten aus definierten
organischen Substraten.

noch Tab. 23 :

Die Produktionsraten wurden in $\mu\text{l H}_2/\text{h} \cdot \text{mg Tm}$ umgerechnet, wobei der Proteingehalt mit 0,65 mg, der Chlorophyllgehalt mit 26 μg je mg Trockenmasse und eine Einheit der optischen Dichte bei 600 nm mit 0,65 mg Tm/ml angenommen wurde /82, 83, 84/, (s.a.S. 48).

Weitere Literatur zu den Wasserstoff-Produktionsraten der Rhodospirillaceae findet man u.a. bei Mitsui /7/ und Weaver /21/.

Obwohl die Rate der Gaserzeugung lediglich ein Anhaltspunkt für die Produktivität der Purpurbakterien ist, machen nur wenige Autoren Angaben über die Vollständigkeit des Substratabbaus zu Wasserstoff und Kohlendioxid (s.a.S. 18).

Rhodopseudomonas capsulata setzte danach 72 - 80 % des Lactat-Wasserstoffs frei, Rhodospirillum rubrum 44,5 % aus Glucose, Rp. shaeroides nur 24 %, aus Lactat 48 % und aus Malat 57 %. Eine Rp. sphaeroides Mutante erreichte bis zu 99 % /37, 65, 85, 75/.

In eigenen Versuchen wurde aus einem definierten Lactat-Medium mit Rp. capsulata, als bestes Ergebnis, 86 % des Substrat-Wasserstoffs freigesetzt. Doch die Produktionsrate erreichte niemals die in der Literatur angegebenen Werte, sondern betrug maximal 33,7 $\mu\text{l H}_2/\text{h} \cdot \text{mg Tm}$. Diese Rate konnte über ca. 10 Stunden aufrechterhalten werden, so daß die Gesamtversuchsdauer bis zum Aufhören der Gasproduktion 92 Stunden betrug.

Rp. capsulata benötigte dagegen bei Hillmer /37/ durch die hohe Umsatzgeschwindigkeit für die 72 %-ige Freisetzung des Wasserstoffs nur ca. 40 Stunden.

Daß die Versuchsbedingungen die Produktionsrate stark beeinflussen, haben verschiedene Autoren gezeigt. VorkulturmEDIUM /67/, Substratkonzentration /37/, Temperatur und pH-Wert /12, 17, 86/ usw. können im Laborbetrieb leicht optimiert werden. Obwohl die Ergebnisse dieser in der Literatur beschriebenen Optimierungen mit den eigenen Ergebnissen in der Regel übereinstimmen, wurden doch nicht die beschriebenen Umsatzraten erreicht. Einer der Gründe hierfür könnte eine zu geringe Beleuchtung der Zellsuspensionen sein. Der Lichtsättigungswert für Rp. capsulata von 6,5 - 10 klx /37, 14/, der wahrscheinlich auch für die anderen Rhodospirillaceae gilt, wurde in der auf Seite 27 dargestellten Versuchsanordnung mit einer inhomogenen Beleuchtung der Kulturgefäße durch 40 W Glühlampenlicht nicht erreicht. Eine Steigerung der Beleuchtungsstärke war wegen der Überhitzungsgefahr nicht möglich, während andere Autoren verwendete Lichtstärken von 6,5 bis 40 klx nennen /37, 72, 23, 75/, ohne besondere Kühlmaßnahmen zu erwähnen.

Die bei Lichtmangel auftretende "gemischte Säuregärung" wird bei verschiedenen Bakterienarten beschrieben. Besonders die Enterobacteriaceae setzen

1. durch Pyruvatspaltung Ameisensäure,
2. aus Acetyl-Coenzym A Essigsäure und
3. als Produkt eines mit Elektronentransportphosphorylierung gekoppelten Prozesses durch Reduktion von Fumarat Bernsteinsäure frei.

Propionsäuregärung findet man hauptsächlich bei Propionibakterien, die durch Pyruvatreduktion über den Methylmalonyl-CoA-Weg Propionsäure erzeugen. Andere Bakterien, wie z.B. Clostridium propionicum, produzieren Propionsäure über den Acetyl-CoA-Weg /15/.

Auch bei den Rhodospirillaceae wurden diese Säuren schon, bis auf die Bernsteinsäure, in der Dunkelkultur gefunden. Schön hat daraus ein Schema der Abbauewege von Fructose und Pyruvat für Rs. rubrum /39-41/ entworfen.

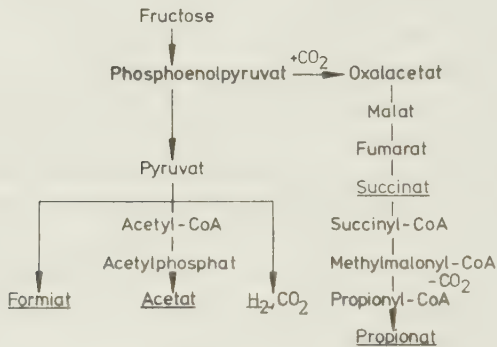


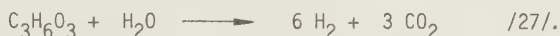
Abb. 34 : Abbauewege von Pyruvat und Fructose in Rs. rubrum nach Schön /39, verändert/. Die Endprodukte sind unterstrichen.

Durch die Identifizierung und Quantifizierung der Säuren kann für die speziellen dargestellten Versuchsergebnisse eine Wasserstoff-Bilanz aufgestellt werden:

62 % des Substrat-Wasserstoffs wurden als Gas freigesetzt,
2 % in der Biomasse und
27 % in Säuren festgelegt.

Der Verbleib von 91 % des Substrat-Wasserstoffs, was 182 % des mit der Milchsäure in das Substrat gegebenen Wasserstoffs

entspricht, wurden durch die Bilanz geklärt und somit Ormerods These bestätigt, nach der die Hälfte des Wasserstoffs aus dem Wasser stammt.



Zusammenfassend kann man sagen, daß im Vergleich zu anderen wasserstoffproduzierenden Mikroorganismen bzw. Organellen die Brennstoffferzeugung durch Rhodospirillaceae einige Vorteile hat:

1. Die Energierückgewinnbarkeit liegt theoretisch höher als bei der Dunkelfermentation, da die Substrate vollständig zu Wasserstoff und Kohlendioxid abgebaut werden können.
2. Der einfache Versuchsaufbau bedarf keiner ständigen Eingriffe, da u.a. im Gegensatz zu den Cyanobakterien und zellfreien Systemen keine das Nitrogenase-Enzymsystem störende Sauerstoff-Produktion reprimiert werden muß.
3. Der unkomplizierten Selbstreproduktion der Wasserstoff erzeugenden Bakterien, die durch entsprechende Mangelmedien auch unterbunden werden kann, steht die aufwendige Isolierung der Einzelkomponenten bei zellfreien Systemen gegenüber.
4. Durch Rhodospirillaceae wurden, nach dem heutigen Stand der Untersuchungen, höhere Erträge erzielt als mit den anderen biologischen Systemen.

Die offensichtlichen Nachteile teilen die Purpurbakterien mit jeweils mindestens einer der anderen Gruppen:

1. Die Rhodospirillaceae haben ebenso wie die anderen phototrophen Organismen einen wesentlich größeren Flächenbedarf als Mikroorganismen der Dunkelfermentation.
2. Während es für die anaerobe Dunkelfermentation in technischem Maßstab seit langem Traditionen und Erfahrungen gibt, sind die Versuche mit phototrophen Mikroorganismen dem Labor noch nicht entwachsen.
3. Nur die Hälfte des von den Purpurbakterien erzeugten Wasserstoffs stammt aus dem Wasser /27/, die andere Hälfte aus organischem Material, das bei der Dunkelfermentation vollständig und bei den Cyanobakterien und zellfreien Systemen zumindestens teilweise als Wasserstoff-Donator dient.

Da die Quelle des zu verwendenden organischen Materials wesentlich den Preis der Wasserstoff-Gewinnung durch Rhodospirillaceae mitbestimmt, synthetische Nährlösungen aus chemisch reinen Substanzen daher nicht in Frage kommen, wurden preiswerte Abfallstoffe oder Nebenprodukte gesucht, die entweder aus einfachen, durch Purpurbakterien abbaubaren Verbindungen bestehen oder durch Vorbehandlung in solche zerlegt werden können.

Eine Vielzahl von Materialien wurden schon auf ihre Abbaubarkeit durch Rhodospirillaceae untersucht, nicht immer mit dem Ziel Wasserstoff zu produzieren, sondern auch, um Einzellerprotein, Düngemittel, metallfreie Corrinoiden und Vitamin B₁₂ zu gewinnen oder Abwasser zu reinigen.

Die ersten Untersuchungen in dieser Richtung wurden von den Arbeitsgruppen Kobayashi in Japan ab 1971, Pfennig in der Bundesrepublik Deutschland ab 1975 und Sawada, Australien 1977 veröffentlicht /87 - 96/. Jedoch keine dieser Arbeiten erwähnt eine Wasserstoff-Produktion der Rhodospirillaceae, was neben

dem erklärten Ziel, Protein zu gewinnen oder Abwasser zu reinigen, auch durch die Zusammensetzung der verwendeten Substrate zu erklären ist.

Abfallmaterial der mikrobiologischen Industrie, z.B. aus der Bier-, Antibiotika-, Amino- und Nucleinsäure-Herstellung, der chemischen Industrie, z.B. der Chemiefaser- oder Kunstdünger-erzeugung, aus der Lebensmittelindustrie, der Gewürzherstellung usw. /90/, Schlachthausabwässer, Abwässer der Wollbearbeitung /96/, Klärschlämme /92, 93/, Fäkalien, Geflügel- und Schweinegülle /90, 91/ enthalten große Mengen Stickstoff, der in Form des Ammoniaks eine Wasserstoff-Produktion ganz unterbindet (s.S.14), und als Aminosäuren bei hohen Konzentrationen die Wasserstoff-Erzeugung minimiert /37/.

In einigen neueren Arbeiten wurde auch die Verwertung stickstoffarmer oder stickstofffreier Abfälle und Nebenprodukte beschrieben: Bachofen und Zürrer untersuchten den Abbau von Molke und Abwässern der Zuckerrübenverarbeitung durch Rs. rubrum /97, 98, 83/, Weetall et al. die Nutzung von Holzsägespänen und hydrolysierte Cellulose durch Rs. rubrum und Klebsiella pneumoniae /85/ und Vincenzini et al. die Verwertung von Zuckerraffinerieabfällen und Papierfabrikabwässern durch Rp. palustris /73/.

In diesen Substraten wurde eine erhebliche Wasserstoff-Produktion beobachtet: Zürrer und Bachofen /97/ gewannen aus Joghurt-Abfällen und Molke mit einer Produktionsrate von $2 - 5 \mu\text{l H}_2/\text{h} \cdot \text{mg Tm}$ 67 % des maximal möglichen Wasserstoff-Ertrages und aus Abfällen der mikrobiologischen Milchsäure-Erzeugung 99 % zurück, mit einer Rate von $4 - 6 \mu\text{l H}_2/\text{h} \cdot \text{mg Tm}$. Weetall /85/ erreichte eine Effektivität von 70 %, während Vincenzini /73/ $30 - 35 \mu\text{l H}_2/\text{h} \cdot \text{mg Tm}$ gewann und gleichzeitig

die Abwasserreinigung durch Umwandlung von 28 - 43 % CSB in Wasserstoff angab.

In einigen Untersuchungen war die Umsatzrate der Molke mit bis zu $21 \mu\text{l H}_2/\text{h}\cdot\text{mg Tm}$ größer als bei Zürrer, aber es wurde trotz Vitamin- und Spurenelementezusätze, Optimierung der Substratkonzentration und Vorkultur nur maximal 56 % des höchstmöglichen Gasertrages erzielt.

Der Abbau von Rohrzuckermelasse in den vorliegenden Versuchen mit bis zu $12 \mu\text{l H}_2/\text{h}\cdot\text{mg Tm}$ und 89 % des Substrat-Wasserstoffs und Rübenzuckermelasse mit $15 \mu\text{l H}_2/\text{h}\cdot\text{mg Tm}$ und 42 % verlief langsamer als die Verwertung der damit ungefähr vergleichbaren Raffinerieabfälle, doch wurde ein höherer Klärungsgrad des Abwassers erreicht. Bei Rohrzuckermelasse sank der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) um 61 % und bei Rübenzuckermelasse um 63 %.

Den niedrigsten Ertrag und die langsamste Substratumsetzung der untersuchten Lebensmittelnebenprodukte maß ich mit Rhodospirillum rubrum in Kartoffelfruchtwasser. Mit einer Rate von $7,6 \mu\text{l H}_2/\text{h}\cdot\text{mg Tm}$ wurden nur 19 % des Wasserstoffs freigesetzt, was einem Volumen von $7,6 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3$ Kartoffelwasser oder 45 % der Energiemenge entspräche, die van Bellegem in Form von Biogas aus Abwässern der Kartoffelstärkeindustrie mit $6,5 - 7,5 \text{ m}^3/\text{m}^3$ gewinnt /99/.

Ob den genannten Untersuchungen über die Wasserstoff-Produktion mit Rhodospirillaceae aus Abwässern /73,83,85,97,98/ ein Bakterienscreening vorausging, wurde in den Veröffentlichungen nicht erwähnt. Doch die Wahl des Purpurbakteriums Rs. rubrum, das auch in meinen Versuchen im Vergleich zu den anderen Rhodospirillaceae bei weitem die höchsten Erträge

erzielte in vier von fünf Fällen, deutet darauf hin.

Rp. capsulata, Rp. acidophila, Rm. vanniellii und Rs. tenue verwerten die angebotenen Substrate nur schlecht.

Die Annahme, die Nichtbedürftigkeit an Vitaminen bei Rp. acidophila, Rm. vanniellii und Rs. tenue könnte mit einer hohen Wasserstoff-Produktion verbunden sein, erwies sich als falsch. Auch eine Ergänzung der Substrate durch Spurenelemente brachte nur geringe Ertragssteigerungen. Eine Ausnahme bildet hier die Rohrzuckermelasse, Produktionssteigerungen von 1 - 8 % des Substrat-Wasserstoffs waren durch Spurenelementezusätze zu verzeichnen.

Für eine mögliche praktische Anwendung ist das allerdings ohne Belang, denn aufgrund der dargestellten Ergebnisse wäre Rs. rubrum der Organismus der Wahl, falls es je zu industriellen Abbau von Abwässern oder Lebensmittel-Nebenprodukte durch Rhodospirillaceae kommen sollte.

Der Biotingehalt der Substrate Molke und Rohrzuckermelasse war für Rs. rubrum in den gezeigten Versuchen zu gering. Durch den Zusatz des Vitamins ließ sich der Ertrag noch um 10 bzw. 6 % des maximal möglichen Wasserstoffs steigern. Ob aber in der Praxis das relativ teure Biotin zur Freisetzung dieser Wasserstoffmenge eingesetzt würde, hinge von einer Kosten-Nutzen-Rechnung ab.

Es bleibt fraglich, ob es in unseren Breiten überhaupt zu einer praktischen Anwendung, zu einer technischen Wasserstoff-Erzeugung aus Abwässern oder Lebensmittel-Nebenprodukten mit Hilfe von Rhodospirillaceae kommt. Denn Purpurbakterien nutzen das Sonnenlicht als Energiequelle. Ein Fermenter für diese Bakterien müßte deshalb so konstruiert sein, daß er große, der Sonne zugewandte Flächen bedeckt, aber wegen der starken Licht-

absorption durch die Keime nur dünn-schichtig sein darf. Dieser Fermenter muß eine anaerobe Kulturführung und gleichzeitig die Wasserstoff-Ableitung garantieren. Außerdem muß eine Isolierung gegen extreme Temperaturen vorhanden sein, denn bei direkter Sonneneinstrahlung wird die Optimaltemperatur der Rhodospirillaceae von 303 K schnell über- und in der Nacht, sowie im Frühling und im Herbst schnell unterschritten. Im Winter ist ein Betrieb, auch wegen des Lichtmangels, sicher nicht sinnvoll. Ein Fermenter, der all diese Forderungen erfüllt, könnte die schlechten Ergebnisse der Freilandversuche, die nur 51 - 76 % der Laborwerte ausmachten, korrigieren.

In der Literatur wurden zwar schon Wasserstoff-Erträge aus der Freilandkultur und einer synthetischen Nährlösung in der Größenordnung der Laborproduktionen erwähnt, doch war die Versuchsdauer von 25 Tagen bis zum Aufhören der Gasfreisetzung unverhältnismäßig lang /100, 72, 77/ gegenüber den von mir gemessenen 46 % Ertrag in 7 Tagen.

Für die Tauglichkeit eines biologischen Systems in der technischen Anwendung sind neben der höchstmöglichen Energiebereitstellung ein einfacher und unkomplizierter Produktionsprozeß, die Dauerhaftigkeit und die Unempfindlichkeit gegen Störungen die wichtigsten Voraussetzungen.

Die Unkompliziertheit der Wasserstoff-Produktion mit Rhodospirillaceae im Vergleich zu anderen biologischen Systemen wurde bereits dargestellt (S. 2f, 114 ff). Daß in kontinuierlicher bzw. semikontinuierlicher Versuchsführung keine zeitliche Begrenzung des Produktionsprozesses durch ein Nachlassen der Bakterienaktivität abzusehen ist, hat der Langzeitversuch über 2,5 Monate mit Rp. capsulata gezeigt. Durch einen Ausbau des einstufigen Reaktors in einen zwei- oder mehrstufigen, ließe

sich auch die Substratausnutzung von maximal 48 % noch weiter steigern. Lichtmangel oder Sauerstoffeinbrüche als Störungen des Produktionsablaufes haben sich als unkritisch für die Wiederaufnahme der Gaserzeugung erwiesen. Zwar führt sowohl das Fehlen von Licht bzw. die Reduzierung der Beleuchtungsstärke unter 500 lx /14/ als auch eine nur fünf minütige Belüftung der Bakterienkultur zum Aufhören der Wasserstoff-Produktion /19/ (S.77 , 79 f, 74f), doch ist nach der Wiederherstellung anaerober Verhältnisse bzw. einer ausreichenden Beleuchtung die vollständige Reaktivierung der Gaserzeugung nach einer kürzeren oder längeren lag-Phase gegeben. Die Umstellung von der heterotrophen zur phototrophen Lebensweise bedarf bis zum Erreichen der Anfangsaktivität mehr als 2,5 Stunden, wobei die bei Lichtmangel aus dem Substrat anstelle des Wasserstoff produzierten organischen Säuren /39 - 41/ vollständig zu Wasserstoff und Kohlendioxid abgebaut werden.

Die Reaktivierung nach einer Sauerstoff-Begasung kann dagegen 18 - 38 Stunden in Anspruch nehmen (s.S.74 f). Denn durch Sauerstoff wird die Synthese des Nitrogenase-Enzymsystems, das die Wasserstoff-Freisetzung katalysiert, unterdrückt und das Enzym selbst reversibel oder irreversibel gehemmt /68/. Wie Meyer et al. feststellten /23, 68/, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Aktivitätsverlust der Nitrogenase und dem Sauerstoff-Anteil in der Gasphase. Bei 10 % Sauerstoff im Gas wird das Enzym zu 30 - 40 % und bei 30 % Sauerstoff zu 75 % gehemmt. Obwohl es neben empfindlichen auch sehr unempfindliche Rhodospirillaceae-Stämme gibt, wird die maximale Nitrogenase-Aktivität im Licht nur unter anaeroben Bedingungen erreicht. Im Dunklen jedoch stimulieren 5 % Sauerstoff in der Gasphase die Synthese der Nitrogenase /23/ und 1 % Luft in Argon fördert in einer Bakterienmischkultur das Wachstum speziell des Rhodospirillaceae-Vertreterers Rp. capsulata /95/.

Versuche zur Reaktivierung der Wasserstoff-Produktion zeigten, daß nach dem Wiederherstellen anaerober Bedingungen nur dann die Gaserzeugung in vollem Umfang wieder aufgenommen wurde, wenn der Sauerstoff-Anteil in der Gasphase kleiner als 50 % war (s.S. 74). 50 und 100 % bewirkten eine deutliche Reduzierung der Aktivität. Da jedoch bei einem Störfall mit Lufteinbruch in das anaerobe System der Sauerstoff-Anteil in der Gasphase nicht höher als 21 % steigen kann, ist eine Minderung der Aktivität nicht abzusehen. Aber auch eine Steigerung der Wasserstoff-Produktion unter Sauerstoff-Einfluß, wie in Versuch Nr. 4 nach einer Begasung mit 33 % O_2 im Gasgemisch, wäre nicht zu erwarten. Eine Erklärung für die gemessene erhöhte Gaserzeugung bedürfte weiterer Untersuchungen, zumal auch Knobloch /65/ eine Stimulierung der Wasserstoff-Produktion durch Sauerstoff beschreibt.

Da alle bisher durchgeführten Versuche zur Wasserstoff-Produktion der Rhodospirillaceae den Labormaßstab nicht überschritten haben, auch wenn sie in das Freie verlegt wurden, ist eine Prognose über die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens nur sehr schwer anzustellen.

Wenn man die Energiemenge berechnet, die hypothetisch aus 200 m³ Molke, der Tagesproduktion einer mittleren Molkerei, gewonnen werden könnte, ergeben sich recht günstige Werte:

Von der Annahme ausgehend, daß wie in den Freilandversuchen 35 % des in der Molke und dem entsprechenden Wasservolumen festgelegten Wasserstoffs freigesetzt wird, gewinnt man 4144 m³ Gas/200 m³ Molke. Das entspricht einer Wärmemenge von $4,5 \times 10^7$ kJ oder 1000 l Heizöl oder bei einer Ertragssteigerung auf 67 % /97/ ca. 2000 l.

Der Aufwand steht aber in keinem Verhältnis zum Ergebnis. Denn es müßte eine Fläche von $13\,000\text{ m}^2$ mit Fermentern belegt werden, wenn eine Bakterien-schichtdicke von 10 cm und eine Molkekonzentration von 15 % gewählt würde. Bei einer Verweildauer von 10 Tagen für die Fermentierung einer Molke-Tagesproduktion mit Rhodospirillaceae müßte in einem Dauerbetrieb sogar die 10-fache Fläche zur Verfügung stehen, also $130\,000\text{ m}^2$.

Weetall /85/ schätzt die Produktionskosten bei vollständiger Substratausnutzung auf \$ 10,26/1000 ft³ H₂, was etwa 1 DM/m³ H₂ entspricht. Dieser Preis liegt nach seinen Angaben noch 170 - 340 % über dem für technisch erzeugten Wasserstoff, so daß nur eine Kopplung der Energiegewinnung mit der Abfallbeseitigung und Abwasserreinigung, die im anaeroben Prozeß immerhin bis zu 76 % des CSB erreicht, und die Verwertung der Bakterienmasse zur Düngung oder Fütterung diese biologische Brennstoff-Erzeugung rentabel machen könnte.

Es bleibt weiteren Untersuchungen zur Verfahrenstechnik vorbehalten, durch eine Verbesserung von Fermentern auch die Lebensbedingungen der Rhodospirillaceae in der Freilandkultur zu verbessern, um so den Wasserstoff-Ertrag zu erhöhen und gleichzeitig die Fermentationszeit zu senken.

7. Zusammenfassung

Die Abbauraten organischer Substanzen aus einem synthetischen Medium und den Lebensmittel-Nebenprodukten Molke, Rüben- und Rohrzuckermelasse und Kartoffelfruchtwasser mit Hilfe der Rhodospirillaceae Rp. capsulata, Rp. acidophila, Rm. vanniellii, Rs. rubrum und Rs. tenue zu Wasserstoff und Kohlendioxid wurden untersucht.

Hierzu wurde zunächst in einer Vorkultur mit Hilfe von Lactobacillus bulgaricus der Zucker der Nebenprodukte in besser verwertbare Milchsäure umgewandelt.

Bei der Wasserstoff-Erzeugung aus den angebotenen Substraten war Rs. rubrum allen anderen Rhodospirillaceae überlegen. Es setzte aus der synthetischen Lactatnährlösung bis zu 86 % des Substrat-Wasserstoffs frei, aus Molke 56 %, aus Rübenzuckermelasse 42 %, aus Rohrzuckermelasse 89 % und aus Kartoffelfruchtwasser 19 %.

Der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) als Grad der Umweltbelastung sank bei Molke durch die Behandlung mit Rs. rubrum von 67 auf 16 g/l. Der CSB von Rüben- und Rohrzuckermelasse sank von 730 bzw. 700 auf 270 g/l, der von Kartoffelfruchtwasser blieb mit 43 g/l unverändert.

In Freilandversuchen wurde die Ertragsreduzierung und die Verlängerung der Versuchsdauer durch Witterungseinflüsse und Tag-Nacht-Wechsel im Vergleich zu den konstanten Laborbedingungen aufgezeigt.

Aus 200 m³ Molke, der Tagesproduktion einer mittleren Molkerei, könnten so ca. 4000 m³ Wasserstoff, was etwa 1000 l Heizöl

entspräche, freigesetzt werden. Im Batch-Betrieb müßten dafür 130 000 m² mit Fermentern belegt werden.

Aus diesen Zahlen wird ersichtlich, daß die Verwertung von Lebensmittel-Nebenprodukten durch Rhodospirillaceae in technischem Maßstab, zumindest auf dem heutigen Stand der Untersuchungen, kaum Chancen einzuräumen sind, wenn nicht grundsätzliche Verfahrensänderungen z.B. mit Flow-Fermentern das Umsatzvolumen und die Umsatzrate wesentlich erhöhen können.

8. Literatur

- /1/ BMFT:
"Zweites Programm Energieforschung und Energietechnologien", 1981.
- /2/ BMFT:
"Neue und erneuerbare Energiequellen", 2. Aufl., 1981.
- /3/ H. Tributsch:
"Rückkehr zur Sonne", Safari-Verlag Berlin, 1979.
- /4/ P. Kolbusch und W. Schäfer:
"Biologisch-technische Systeme zur Energiegewinnung",
Studie der Dornier-System GmbH, i.A. des BMFT.
- /5/ 2. Conference on Energy from Biomass, 20.-23.9.82,
Berlin.
- /6/ W. Peschka:
"Wasserstoff als Alternativkraftstoff im Kraftfahrzeug", Internationales Verkehrswesen 32 (1980)
447 - 454.
- /7/ A. Mitsui, Y. Ohta, J. Frank, S. Kumazawa, C. Hill,
D. Rosner, S. Barciella, J. Greenbaum, L. Haynes,
L. Oliva, P. Dalton, J. Radway and P. Griffard:
"Photosynthetic Bacteria as Alternative Energy Sources:
Overview on Hydrogen Production Research",
Proceedings of the 2nd International Conference on
Alternative Energy Sources II, Vol. 8, Hydrogen Energy
(1980) 3483 - 3510.

- /8/ T.D. Brock:
"Biology of Microorganisms", Prentice-Hall, Inc.,
3rd edition 1979.
- /9/ B. Gerting:
"Gewinnung elektrischer Energie aus photobiologisch
erzeugtem Wasserstoff mittels Brennstoffzellen",
Studienarbeit 1980, Technische Universität Berlin,
FB Verfahrenstechnik.
- /10/ E. Broda:
"Großtechnische Verwendung der Sonnenenergie durch
Photochemie", Naturwissenschaftliche Rundschau 10
(1975) 365 - 372.
- /11/ P. Böger:
"Utilization of Solar Energy by Biological Production
of Hydrogen - An Approach from Fundamental Research",
Atomenergie, Kerntechnik 33 (1979) 1fg. 1.
- /12/ R. Breed:
"Bergey's Manual of Determinative Bacteriology",
Williams and Wilkins Comp., 8. Aufl., 1974.
- /13/ E.N. Kondratiewa:
"Photosynthetic Bacteria", Izdatelstwo Akademii
Nauk SSSR, Moskwa 1963, Institut Mikrobiologii.
- /14/ U. Reh:
"Wasserstoffproduktion durch das Purpurbakterium
Rhodospseudomonas capsulata", Diplomarbeit 1980,
Freie Universität Berlin, FB Biologie.

- /15/ H.G. Schlegel:
"Allgemeine Mikrobiologie", 5. Aufl., 1981, Georg
Thieme Verlag.
- /16/ H. Gest:
"Bacterial Photosynthesis", Yellow Springs, Ohio,
Antioch. Pr. 1963.
- /17/ C.B. Van Niel:
"The Culture, General Physiology, Morphology and
Classification of the Nonsulfur Purple and Brown
Bacteria", Bacterial Review 8 (1944) 1 - 118.
- /18/ H.-J. Klemme:
"Untersuchungen zur Photoautotrophie mit molekularem
Wasserstoff bei neuisolierten schwefelfreien Purpur-
bakterien", Arch. Mikrobiol. 64 (1968) 29 - 42 .
- /19/ J.G. Ormerod, K.S. Ormerod and H. Gest:
"Light-Dependent Utilization of Organic Compounds
and Photoproduction of Molecular Hydrogen by
Photosynthetic Bacteria; Relationships with Nitrogen
Metabolism", Arch. Biochem. Biophys. 94 (1961)
449 - 463.
- /20/ P.F. Weaver, J.D. Wall, and H. Gest:
"Characterization of Rhodopseudomonas capsulata ",
Arch. Microbiol. 105 (1975) 207 - 216.
- /21/ P.F. Weaver, S. Lien, and M. Seibert:
"Photobiological Production of Hydrogen", Review Paper
in Solar Energy 24 (1980) 3 - 45 .

- /22/ D.O. Hall:
"Solar Energy Conversion Trough Biology - Is it a Practical Energy Source ?", Internationale Tagung, "Bioenergie, Energie aus lebenden Systemen", Zürich 1978.
- /23/ J. Meyer, B.C. Kelley, and P.M. Vignais:
"Effect of Light on Nitrogenase Function and Synthesis in Rhodopseudomonas capsulata", J. Bact. 136 (1978) 201 - 208.
- /24/ H. Gest:
"Energy Conversion and Generation of Reducing Power in Bacterial Photosynthesis", Advances in Microbial Physiology 7 (1970) 243 - 282.
- /25/ H. Gest, J.G. Ormerod, and K.S. Ormerod:
"Photometabolism of Rhodospirillum rubrum: Light-Dependent Dissimilation of Organic Compounds to Carbon Dioxide and Molecular Hydrogen by an Anaerobic Citric Acide Cycle", Arch. Biochem. Biophys. 97 (1962) 21 -33.
- /26/ W. Nultsch:
"Allgemeine Botanik", 5. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974.
- /27/ J.G. Ormerod, H. Gest:
"Hydrogen Photosynthesis and Alternative Metabolic Pathways in Photosynthetic Bacteria", Bact. Rev. 26 (1962) 51 - 65.

- /28/ A.L. Lehninger:
"Biochemie", 2. Aufl., Verlag Chemie 1977.
- /29/ R.K. Clayton, W.R. Sistrom (eds.):
"The Photosynthetic Bacteria", Plenum Press 1978.
- /30/ J. Phillipson:
Oikos 15 (1964), zitiert nach /31/.
- /31/ Meßvorschrift des Instituts für Biophysik der
Freien Universität Berlin.
- /32/ K.R. Gunther:
Biotech. Bioeng. 7 (1965) 445 - 446, zitiert nach /35/.
- /33/ G.J. Prochazka, W.J. Payne, W.R. Mayberry:
Biotech. Bioeng. 15 (1973) 1007 - 1010, zitiert nach /35/.
- /34/ H.Y. Wang, D.G. Mou, J.R. Swartz:
Biotech. Bioeng. 18 (1976) 1811 - 1814, zitiert nach /35/.
- /35/ I. Lamprecht:
"Growth and Metabolism in Yeast" in "Biological Micro-
calorimetry" (A.E. Beezer. ed.) Academic Press 1980.
- /36/ C.B. Van Niel:
(1936) zitiert nach /13/.
- /37/ P. Hillmer, H. Gest:
" H_2 Metabolism in the Photosynthetic Bacterium
Rhodospseudomonas capsulata: H_2 Production by
Growing Cultures", J. Bact. 129 (1977) 724 - 731.

- /38/ G. Drews:
"Mikrobiologisches Praktikum", Springer Verlag,
3. Aufl. 1976.
- /39/ G. Schön, M. Biedermann:
"Bildung flüchtiger Säuren bei der Vergärung von
Pyruvat und Fructose in anaerober Dunkelkultur
von Rhodospirillum rubrum", Arch. Mikrobiol. 85
(1972) 77 - 90.
- /40/ G. Schön, M. Biedermann:
"Growth and Adaptive Hydrogen Production of Rhodo-
spirillum rubrum (F₁) in Anaerobic Dark Cultures",
Biochim. Biophys. Acta 304 (1973) 65 - 75 .
- /41/ G. Schön, J. Somssich:
"Einfluß von Vorkultur und Lichtintensität auf die
Aktivität der Pyruvat-metabolisierenden Enzyme
in Rhodospirillum rubrum", Vortrag auf der 38. Tagung
der DGHM 1981 in Göttingen.
- /42/ Arbeitsvorschrift des Instituts für Lebensmittelchemie
der Technischen Universität Berlin.
- /43/ H.J. Rehm:
"Industrielle Mikrobiologie", Springer Verlag,
2. Aufl. 1980
- /44/ Verein der Zuckerindustrie (Hrsg):
"Technologie des Zuckers", M. + H. Schaper Verlag,
Hannover 1955.

- /45/ F. Göbel:
"Quantum Efficiencies of Growth" in /29/.
- /46/ I. Rechenberg:
"Wasserstoff-Erzeugung mit Purpurbakterien", Eigen-
druck Technische Universität Berlin 1981.
- /47/ H. Lüthje (Hrsg):
"Lehrbuch der Chemie", Otto Salle Verlag 1968.
- /48/ R. Brettel:
in "Application of Calorimetry in Life Sciences"
(I. Lamprecht, B. Schaarschmidt, eds.) Verlag de
Gruyter Berlin 1977.
- /49/ Arbeitsvorschrift des Instituts für Lebensmittelchemie
der Technischen Universität Berlin.
- /50/ Fa. Boehringer Mannheim:
"Enzymatische Lactatbestimmung", Anwendungsvorschrift.
- /51/ W. Leithe:
"Ein beschleunigtes Verfahren zur Bestimmung des
chemischen Sauerstoffbedarfes in Wässern mit Kalium-
pyrochromat", Österreichische Abwasser Rundschau 15
(1970) 25 - 28 .
- /52/ Kommission der Europäischen Gemeinschaften:
"Die Gesellschaft von morgen - eine Biogesellschaft ?",
Generaldirektion Information 11/80 (1980).

- /53/ R.O.D. Dixon:
"Hydrogenase in Legume Root Nodule Bacteroids:
Occurrence and Properties", Arch.Microbiol. 85
(1972) 193 - 201.
- /54/ K.R. Schubert, H.J. Evans:
"Hydrogen Evolution: A Major Factor Affecting the
Efficiency of Nitrogen Fixation in Nodulated Sym-
bionts", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73,2 (1976)
1207 - 1211.
- /55/ T. Matsunga, I. Karube, S. Suzuki:
"Some Observations on Immobilized Hydrogen-Producing
Bacteria: Behavior of Hydrogen in Gel Membranes",
Biotech. Bioeng. 22,12 (1980) 2607 - 2615.
- /56/ P. De Vos, P. Stevens, J. De Ley:
"Hydrogen Gas Production from Formate and Glucose by
Different Members of the Enterobacteriaceae",
Biotech. Letters 5,2 (1983) 69 - 74.
- /57/ A.M. Klibanow, B.N. Alberti, S.E. Zale:
"Enzymatic Synthesis of Formic Acid from H₂ and CO₂
and Production of Hydrogen from Formic Acid",
Biotech. Bioeng. 24 (1982) 25 - 36.
- /58/ E.T. Efimtsev, V.A. Boichenko, F.F. Litbin:
"Photoinduced Hydrogen Evolution by Bacteria, Algae
and Higher Plants", Dokl. Bot. Sci. 220 - 222
(1975) 6 - 8.

- /59/ E. Ernst, W. Kerfin, H. Spiller, P. Böger:
"External Factors Influencing Light-Induced Hydrogen
Evolution by the Blue-Green Alga, Nostoc muscorum",
Z. Naturforsch. 34c (1979) 820 -825.
- /60/ H. Spiller, A. Ernst, W. Kerfin, P. Böger:
"Increase and Stabilization of Photoproduction of
Hydrogen in Nostoc muscorum by Photosynthetic Electron
Transport Inhibitors", Z. Naturforsch. 33c (1978)
541 - 547.
- /61/ S. Scherer, W. Kerfin, P. Böger:
"Regulatory Effect of Hydrogen on Nitrogenase Activity
of the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) Nostoc muscorum";
J. Bact. 141,3 (1980) 1037 - 1040.
- /62/ W. Gellert, H. Küstner, W. Seidel, K. Senglaub (Hrsg):
"Natur", VEB Bibliographisches Institut, Leipzig 1966.
- /63/ J.R. Benemann, J.A. Berenson, N.O. Kaplan, M.D. Kamen:
"Hydrogen Evolution by a Chloroplast-Ferredoxin-Hydro-
genase System", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70 (1973)
2317 - 2320.
- /64/ I. Fry, G. Papageorgiou, E. Tel-Or, L. Packer:
"Reconstitution of a System for H₂ Evolution with
Chloroplasts, Ferredoxin, and Hydrogenase",
Z. Naturforsch. 32c (1977) 110 - 117.

- /65/ O. Knobloch:
"Untersuchungen über die Nitrogenasebildung und
- aktivität bei einigen Rhodospirillaceenarten
unter verschiedenen Sauerstoff-Partialdrucken
im Licht und im Dunklen, sowie über Wasserstoff-
bildung", Diplomarbeit 1980, Universität Göttingen.
- /66/ A. Colbeau, B.C. Kelley, P.M. Vignais:
"Hydrogenase Activity in Rhodopseudomonas capsulata
Relationship with Nitrogenase Activity", J. Bact.
144,1 (1980) 141 - 148 .
- /67/ P. Hillmeyer, H. Gest:
"Hydrogen Metabolism in the Photosynthetic Bacterium
Rhodopseudomonas capsulata: Production and Utili-
zation of H₂ by Resting Cells" J. Bact. 129 (1977)
732 - 739.
- /68/ J. Meyer, B.C. Kelley, P.M. Vignais:
"Nitrogen Fixation and Hydrogen Metabolism in
Photosynthetic Bacteria", Biochemie 60,3 (1978)
245 - 260.
- /69/ H. Song, H. Chen, M. Wu, B. Chen, B. Yu:
"Relationship between Hydrogenase and Nitrogenase
in Hydrogen Metabolism of Photosynthetic Bacterium
Rhodopseudomonas capsulata", Sci. Sin. 23,2
(1980) 252 - 260.

- /70/ A.A. Tsygankow, I.N. Gotow:
"Influence of Temperature and pH of the Medium on
the Nitrogenase and Hydrogenase Activity of
Rhodopseudomonas capsulata in Nitrogen Fixation",
Microbiol. 51,3 (1982) 325 - 329.
- /71/ P. Hillmer, H. Gest:
"Hydrogen Production by Clostridia and Photosynthetic
Bacteria" in "Symposium on Microbial Production and
Utilization of Gases" (H.G. Schlegel, G. Gottschalk,
N. Pfennig, eds.) E. Goltze Verlag KG, Göttingen 1976.
- /72/ J.S. Kim, K. Ito, H. Takahashi:
"Production of Molecular Hydrogen by Rhodopseudomonas
sp.", J. Ferm. Technol. 59,3 (1981) 185 - 190.
- /73/ M. Vincenzini, W. Balloni, D. Mannelli, G. Florenzano:
"A Bioreactor for Continuous Treatment of Waste Waters
with Immobilized Cells of Photosynthetic Bacteria",
Experienta 37 (1981) 710 - 712.
- /74/ W.G. Zumpft, D.J. Arp:
"Increased Photoproduction of Hydrogen by Intra Cellular
Accumulation of Nitrogenase in Phototrophic Bacteria",
Naturwissenschaften 68,8 (1981) 424 - 425.
- /75/ B.A. MacIer, R.A. Pelroy, J.A. Bassham:
"Hydrogen Formation in Nearly Stoichiometric Amounts
from Glucose by a Rhodopseudomonas spaeroides Mutant",
J. Bact. 138,2 (1979) 446 - 452.

- /76/ L.T. Serebryakowa, E.A. Teslya, I.N. Gogotow,
E.N. Kondratiewa:
"Nitrogenase and Hydrogenase Activity of the Nonsulfur
Purple Bacteria Rhodopseudomonas sphaeroides and
Rhodopseudomonas capsulata", Microbiol. 49,3 (1980)
280 - 286.
- /77/ J.S. Kim, H. Yamauchi, K. Ito, H. Takahashi:
"Selection of a Photosynthetic Bacterium Suitable for
Hydrogen Production in Outdoor Cultures Among Strains
Isolated in Seoul, Taegu, Sendai and Bangkok Areas",
Agric. Biol. Chem. 46,6 (1982) 1469 - 1474.
- /78/ K.I. Watanabe, J.S. Kim, K. Ito, L. Buranakari,
T. Kampee, H. Takahashi:
"Thermostable Nature of Hydrogen Production by
Nonsulfur Purple Photosynthetic Bacteria Isolated
in Thailand", Agric. Biol. Chem. 45,1 (1981)
217 - 222.
- /79/ T. Matsunga, L. Haynes, A. Mitsui:
"Substrate Specificity and Hydrogen Photoproduction
by Marine Photosynthetic Bacteria Rhodopseudomonas sp.",
82nd Annual Meeting of American Society for Micro-
biology, Atlanta, GA., USA, 1982, Abstr. Annual Meet.
Am. Soc. Microbiol. 82,0 (1982).
- /80/ J. Mijake, N. Tomizuka, A. Kamibayashi:
"Prolonged Photo-Hydrogen Production by Rhodospirillum
rubrum", J. Ferm. Technol. 60,3 (1982) 199 - 203.

- /81/ W.J. Sweet, R.H. Burris:
"Inhibition of Nitrogenase Activity by NH_4^+ in
Rhodospirillum rubrum", J. Bact. 145,2 (1981)
824 - 831.
- /82/ K. Sasaki, N. Noparatnaraporn, M. Hayashi,
Y. Nishizawa, S. Nagai:
"Single-Cell Production by Treatment of Soybean
Wastes with Rhodopseudomonas gelatinosa", J.
Ferm. Technol. 59,6 (1981) 471 - 477.
- /83/ H. Zürrer:
"Hydrogen Production by Photosynthetic Bacteria",
Experienta 38,1 (1982) 64 - 66 .
- /84/ H. Lehmann:
"Wachstumsphysiologische Untersuchungen an fakultativ
aeroben und mikroaeroben Rhodospirillaceae und
Charakterisierung ihrer Elektronentransportsysteme",
Dissertation, Universität Göttingen 1976.
- /85/ H.H. Weetall, B.P. Sharma, C.C. Detar:
"Photometabolic Production of Hydrogen from Organic
Substrates by Free and Immobilized Cultures of
Rhodospirillum rubrum und Klebsiella pneumoniae",
Biotechnol. Bioeng. 23,3 (1981) 605 - 614.
- /86/ A.A. Tsygankow, E.A. Pawlowa, I.N. Gotow:
"Activity of Certain Enzymes Participating in the
Metabolism of H_2 in Rhodopseudomonas capsulata
Depending on the Conditions of Growth of the Culture",
Microbiol. 51,2 (1982) 153 - 157.

- /87/ M. Kobayashi, M. Kobayashi, N. Nakanishi:
"Construction of a Purification Plant for Polluted
Water Using Photosynthetic Bacteria",
J. Ferm. Technol. 49,9 (1971) 817 - 825.
- /88/ M. Kobayashi, M.Z. Haque:
"Contribution to Nitrogen Fixation and Soil Fertility
by Photosynthetic Bacteria", Plant and Soil, Special
Volume (1971) 443 - 456.
- /89/ M. Kobayashi:
"Treatment of Industrial Waste Solutions and Production
of Useful By-Products Using a Photosynthetic Bacterial
Method", Water Research 7,2 (1973) 1219 - 1224.
- /90/ M. Kobayashi:
"Utilization and Disposal of Wastes by Photosynthetic
Bacteria", Seminar 1976, Göttingen.
- /91/ E. Siefert:
"Quantenbedarf phototropher Bakterien", Jahresbericht
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH,
München, 1975.
- /92/ F. Widdel:
"Die Verwertung anaerober Schlämme durch phototrophe
Purpurbakterien", Diplomarbeit, Universität Göttingen,
1975.
- /93/ E. Siefert, R.L. Irgens, N. Pfennig:
"Phototrophic Purple and Green Bacteria in a Sewage
Treatment Plant", Appl. Envir. Microbiol. 35,1 (1978)
38 - 44.

- /94/ H. Sawada, P.L. Rogers:
"Photosynthetic Bacteria in Waste Treatment.
Pure Culture Studies with Rhodopseudomonas
capsulata", J. Ferm. Technol. 55,4 (1977)
297 - 310.
- /95/ H. Sawada, P.L. Rogers:
"Photosynthetic Bacteria in Waste Treatment.
Mixed Culture Studies with Rhodopseudomonas
capsulata", J. Ferm. Technol. 55,4 (1977)
311 - 325.
- /96/ H. Sawada, R.C. Parr, P.L. Rogers:
"Photosynthetic Bacteria in Waste Treatment.
Role of Rhodopseudomonas capsulata with Agri-
cultural/Industrial Effluents", J. Ferm. Technol.
55,4 (1977) 326 - 336.
- /97/ H. Zürrer, R. Bachofen:
"Hydrogen Production by the Photosynthetic Bacterium
Rhodospirillum rubrum", Appl. Envir. Microbiol. 37,5
(1979) 789 - 793.
- /98/ R. Bachofen:
"Nutzung der Sonnenenergie-Möglichkeiten mit Mikro-
organismen", Experienta 36,12 (1980) 1429 - 1433.
- /99/ T.M. Van Bellegem:
"Methane Production from the Effluent of the Potato
Starch Industry", Biotech. Letters 2,5 (1980)
219 - 224.
- /100/ J.S. Kim, K. Ito, H. Takahashi:
"Production of Molecular Hydrogen in Outdoor Batch
Cultures of Rhodopseudomonas sphaeroides",
Agric. Biol. Chem. 46,4 (1982) 937 - 942.

LEBENS LAUF

- 09.05.1954 geboren als einziges Kind der Maßschneiderin Ingeburg Reh, geborene Jaensch und des Tischlermeisters Werner Reh in Berlin.
- Ab April 1961 Besuch der Schwielowsee-Grundschule in Berlin-Schöneberg.
- Ab April 1967 Besuch des Sophie-Scholl-Gymnasiums in Berlin-Schöneberg.
- Dezember 1973 Abitur im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig der Schule.
- 01.06.-30.09.1973 Volontärin im Institut für Tierproduktion der Technischen Universität Berlin.
- 08.03.-15.10.1974 Tierwärterin im Institut für Tierproduktion der Technischen Universität Berlin.
- Ab Oktober 1974 Biologiestudium an der Freien Universität Berlin.
- 11.11.1977 Heirat mit dem Bauingenieur Michael Lehmann-Reh, geborener Lehmann.
- 01.10.1977 - 30.09.1980 Tutor im Institut für Biophysik des Fachbereichs Biologie der Freien Universität Berlin.
- 1979 - 1980 Anfertigung der Diplomarbeit "Wasserstoff-Produktion durch das Purpurbakterium Rhodospseudomonas capsulata" im Fachgebiet Bionik und Evolutionstechnik der Technischen Universität Berlin bei Prof. Dr.-Ing. I. Rechenberg und Prof. Dr. I. Lamprecht (Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin).

01.06. - 30.11.1981 Wissenschaftliche Angestellte im Institut
für Lebensmittelchemie der Technischen
Universität Berlin.

1981 - 1983 Anfertigung der Dissertation im Institut
für Lebensmittelchemie der Technischen
Universität Berlin bei Prof.Dr. W. Krischke
und Prof.Dr. I. Lamprecht (Institut für
Biophysik der Freien Universität).

